



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ATAXIA EM POLDROS DERIVADA DA INGESTÃO DE PASPALUM

ANA LÚCIA DE ANDRADE PATRÍCIO PETRICA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

**Doutor Carlos Mendes Godinho de
Andrade Fontes**

**Doutor Miguel Luís Mendes Saraiva
Lima**

**Doutora Anabela de Sousa Santos da
Silva Moreira**

Dr. José Carlos Miguéis Nunes Duarte

ORIENTADOR

Dr. José Carlos Miguéis Nunes Duarte

CO-ORIENTADOR

**Doutor Miguel Luís
Mendes Saraiva Lima**

2010

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ATAXIA EM POLDROS DERIVADA DA INGESTÃO DE PASPALUM

ANA LÚCIA DE ANDRADE PATRÍCIO PETRICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

**Doutor Carlos Mendes Godinho de
Andrade Fontes**

Doutor Miguel Luís Mendes Saraiva Lima

**Doutora Anabela de Sousa Santos da Silva
Moreira**

Dr. José Carlos Miguéis Nunes Duarte

ORIENTADOR

Dr. José Carlos Miguéis Nunes Duarte

CO-ORIENTADOR

Doutor Miguel Luís

Mendes Saraiva Lima

2010

LISBOA

Aos meus pais e aos meus avós

AGRADECIMENTOS

O meu mais profundo agradecimento devoto-o aos meus pais pelo suporte que sempre me proporcionaram e acima de tudo por me terem sempre transmitido os melhores valores. Enalteço a sua dedicação e a esperança que me confiaram, muito obrigada por todo o amor com que me educaram e por este futuro que colocam agora nas minhas mãos.

Aos meus avós teço um profundo reconhecimento pelas lições de vida que me ensinaram e por me ajudarem a acreditar em mim própria, dia após dia e dificuldade após dificuldade. Devo-lhes o gosto pelos cavalos, pela pecuária e pelo campo, muito obrigada pela força de viver que me transmitiram, pelos valiosos conselhos e pelo eterno amor.

Agradeço à minha irmã pela admiração que sempre me dedicou, muito abrigada por essa inspiração, pelo teu fraterno sorriso e doce paciência.

Ao Professor Doutor Miguel Saraiva Lima agradeço a disponibilidade e auxílio, e com profunda admiração reconheço a paixão e a garra que incute aos seus alunos, assim como a sua genuína vontade em ajudá-los a acreditarem em si mesmos. Muito obrigada por todo o apoio, confiança e inspiração.

Agradeço ao Doutor Nuno Bernardes pela pronta ajuda que me ofereceu, pelos sábios ensinamentos que partilhou e pela constante simpatia.

Agradeço ao Doutor José Carlos Duarte e toda a restante equipa da LusoPecus por me terem prontamente recebido, integrado e partilhado os seus métodos de trabalho e organização.

Ao Doutor Raul Ricardo dedico enorme respeito e admiração, agradecendo todas as experiências que aceitou partilhar comigo e a sua amizade.

Eterno agradecimento à minha querida professora de História, Maria de Lourdes Teixeira, pela sua marcante contribuição na minha formação como pessoa e pela magia das suas aulas e da sua amizade, muito obrigada por todos os momentos inesquecíveis e por todas as conversas encantadoras. Outro doce agradecimento para a minha querida professora de Português, Maria Paula Mendes, pela sua amizade e por me ter incentivado a render-me à “magia da palavra” e ao dom de escrever. Por último agradeço à professora Verinha e ao seu anjo da guarda a encantadora jovialidade, os votos de sorte e a incondicional amizade.

Aos meus amigos um especial agradecimento pelo companheirismo que sempre me demonstraram, pela sua presença e apoio. Muito obrigada pela verdadeira amizade, preocupação e por aquele forte abraço nos momentos de revolta.

Ao Miguel, o agradecimento mais terno por me ter mostrado que o horizonte era muito mais vasto do que eu imaginava, e era alcançável...

Resumo

Ataxia em poldros derivada da ingestão de *Paspalum*

A ataxia do *Paspalum* é uma doença neurológica que ocorre quando os animais de pastoreio ingerem *Paspalum* spp. infectado com o fungo *Claviceps paspali*. Por volta de Setembro/Outubro os corpos escleróticos do fungo substituem as sementes do *Paspalum*, os quais contêm os princípios tóxicos responsáveis pela sintomatologia. Esses princípios tóxicos são micotoxinas tremorgénicas, aparentemente específicas na sua actividade biológica, que originam tremores através de alterações bioquímicas reversíveis que afectam a neurotransmissão. Os sinais clínicos apresentados são tremores, os quais se tornam exacerbados através da execução de movimentos e stress, hiperexcitabilidade e ataxia. À medida que a doença progride os tremores musculares pioram e os animais podem ficar prostrados e incapazes de se erguerem. Portanto, animais que manifestem sinais clínicos ligeiros devem ser rapidamente retirados da pastagem e por norma recuperam espontaneamente.

A mortalidade associada à doença é causada geralmente por acidentes ou pela incapacidade dos animais afectados obterem água, o que significa que, despistando os sinais clínicos típicos, esta condição não é fatal na medida em que sejam providenciadas medidas para que o cavalo não se traumatize no seguimento de quedas.

O diagnóstico é baseado primordialmente na história, sinais clínicos, observação de *Paspalum* na pastagem, despiste de outras doenças que causem estimulação do Sistema Nervoso e nas melhorias reveladas pelos animais assim que saem da pastagem contaminada. A presença de micotoxinas na pastagem poderá ser avaliada. Porém seriam necessárias análises detalhadas para quantificar individualmente cada toxina e a sua potência. O presente estudo acompanhou a situação de sete poldros com sintomatologia nervosa e seguindo os referidos passos do processo de diagnóstico confirmou tratar-se de ataxia do *Paspalum*. Dois animais padeceram, mas acabaram por constituir o alerta da doença e somente partir desse momento os restantes foram retirados do pasto, confirmando-se a recuperação em poucos dias. Prevenir este problema é essencial e baseia-se em cortar as espigas das plantas ou optar por um pastoreio intermitente.

Palavras-chave: poldros, pastagem, ataxia, *Paspalum*, *Claviceps paspali*, micotoxinas tremorgénicas

Abstract

Paspalum straggers affecting foals

Paspalum straggers is a neurological disease that occurs when cattle and horses graze *Paspalum* spp. infected with the fungus *Claviceps paspali*. By September/October the ergot bodies of the fungus replaced the seed, which contains the toxic agents responsible for clinical signs. That toxic agents are tremorgenic mycotoxins which appear to be specific in their biological activity, causing tremor through reversible biochemical changes affecting neurotransmission. The clinical signs presented are tremors, which are exaggerated by enforced movement and stress, hyperexcitability and ataxia. As the disease progresses, muscle tremors worsen and affected animals may be recumbent and unable to rise. So animals with mild clinical signs should be quickly removed from the pasture and usually recover spontaneously.

Mortalities due to this disease are generally caused by accident or by the inability of affected animals to obtain water. This means that, detected the typical signs, the condition is not fatal if the required measures are provided so that the horse does not injure itself with a fall.

The diagnosis is based primarily upon history, clinical signs, observation of *Paspalum* in pasture, elimination of other causes of central nervous system stimulation and health improvement after removing the animals from infected pasture. The presence of mycotoxins in pasture can be assayed, but a detailed analysis is required to determine the quantity of individual mycotoxins present and their potency. This study followed the situation of seven foals with neurological symptoms which grazed *Paspalum* infected with *C. paspali*. Two animals died, but eventually constituted a warning of the disease and thereafter the other animals were removed from pasture, confirming the recovery in a few days. Prevention of this problem is based on mowing the seed heads off the plant or using a intermittent grazing.

Key words: foals, pasture, paspalum staggers, *Claviceps paspali*, tremogenic micotoxins.

Índice

Dedicatória	i
Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Índice.....	ix
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Tabelas.....	xiii
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	xiv

Parte I

1. Relatório de Estágio.....	1
2. Estrutura da Dissertação.....	5

Parte II – Micotoxinas da pastagem: Revisão Bibliográfica

1. Nota introdutória.....	6
2. Micotoxinas no mundo equino.....	8
3. Fungos micotoxigénicos.....	9
3.1. Abordagem generalista ao Reino Fungi.....	9
3.2. Métodos utilizados para detectar fungos toxigénicos.....	12
3.2.1. Métodos baseados na utilização de meios de cultura diferenciais.....	12
3.2.2. Métodos baseados em técnicas cromatográficas.....	12
3.2.3. Métodos baseados em técnicas imunológicas.....	13
3.2.4. Métodos baseados em técnicas de análise de ADN.....	13
3.2.4.1. RT-PCR.....	14
4. Micotoxinas.....	15
4.1. Definições e Princípios Gerais.....	15
4.2. Factores que afectam a produção de micotoxinas.....	16
4.3. Modo de acção das micotoxinas.....	19

4.4. Micotoxicoses no equino.....	27
4.4.1. Micotoxicoses associadas à produção de cereais.....	28
4.4.1.1. Aflatoxina: aflatoxicose.....	28
4.4.1.1.1. Definição e ocorrência.....	28
4.4.1.1.2. Sinais clínicos.....	30
4.4.1.1.3. Fisiopatologia.....	30
4.4.1.1.4. Diagnóstico e tratamento.....	31
4.4.1.2. Fumonisinias: leucoencefalomalácia equina.....	32
4.4.1.2.1. Definição e ocorrência.....	32
4.4.1.2.2. Sinais clínicos.....	34
4.4.1.2.3. Fisiopatologia.....	35
4.4.1.2.4. Diagnóstico e tratamento.....	36
4.4.2. Micotoxicoses associadas à pastagem e à produção de forragem.....	37
4.4.2.1. Alcalóides da cravagem do centeio: ergotismo e intoxicação por festuca.....	37
4.4.2.1.1. Definição e ocorrência.....	37
4.4.2.1.2. Sinais clínicos.....	41
4.4.2.1.3. Fisiopatologia.....	42
4.4.2.1.4. Diagnóstico e tratamento.....	42
4.4.2.2. Eslaframina: síndrome salivar ou doença das manchas negras.....	43
4.4.2.2.1. Definição e ocorrência.....	43
4.4.2.2.2. Sinais clínicos.....	43
4.4.2.2.3. Fisiopatologia.....	44
4.4.2.2.4. Diagnóstico e tratamento.....	44
4.4.3. Micotoxicoses tremorgénicas.....	44
4.4.3.1. Paspalitremis: ataxia do paspalum ou ergotismo nervoso.....	44
4.4.3.1.1. Definição e ocorrência.....	44
4.4.3.1.2. Sinais clínicos.....	45
4.4.3.1.3. Fisiopatologia.....	47
4.4.3.1.4. Diagnóstico e tratamento.....	47
4.4.3.2. Lolitrems: ataxia do azevém.....	49
4.4.3.2.1. Definição e ocorrência.....	49

4.4.3.2.2. Sinais clínicos.....	49
4.4.3.2.3. Fisiopatologia.....	50
4.4.3.2.4. Diagnóstico e tratamento.....	50
4.4.4. Outras micotoxicoses.....	51
4.4.4.1. Causadas por tricotecenos.....	51
4.4.4.2. Causadas por zearalenona.....	52
4.4.4.3. Causadas por ocratoxinas.....	53
5. Gestão de Risco.....	53
5.1. Recursos laboratoriais para detecção e quantificação de micotoxinas.....	53
5.2. Micotoxinas: níveis de tolerância para equinos.....	56
5.3. Medidas de controlo: prevenção das micotoxicoses na pastagem.....	57
5.3.1. Prevenir ou reduzir a ingestão de toxinas.....	57
5.3.1.1. Evitar as pastagens tóxicas.....	57
5.3.1.2. Redução da produção de toxinas.....	58
5.3.1.3. Modificação da população de fungos.....	58
5.3.2. Protecção dos animais contra as toxinas ingeridas.....	59
5.3.3. Obtenção de animais resistentes.....	60

Parte III – Estudo de casos

1. Metodologia.....	61
1.1. Problema.....	61
1.2. Amostra.....	62
1.3. Enquadramento.....	63
1.4. Tipo de estudo.....	65
1.5. Material e métodos.....	65
2. Estudo de casos.....	66
2.1. Caso clínico I.....	66
2.1.1. História pregressa.....	66
2.1.2. Sinais clínicos.....	66
2.1.3. Exames complementares de diagnóstico.....	66
2.2. Caso clínico II.....	68

2.2.1. História pregressa.....	68
2.2.2. Sinais clínicos.....	68
2.2.3. Exames complementares de diagnóstico.....	68
2.3. Casos clínicos III, IV, V, VI e VII.....	70
2.3.1. História pregressa.....	70
2.3.2. Sinais clínicos.....	71
2.3.3. Exames complementares de diagnóstico.....	71
2.3.4. Tratamento e progressão da doença.....	72
3. Discussão dos resultados.....	73
4. Avaliação final.....	79
5. Recomendações.....	79
6. Conclusões.....	80
Bibliografia.....	81

Índice de Figuras

Figura 1: Colheita de sêmen a um garanhão.....	1
Figura 2: Drenagem de abcesso na sola do casco.....	2
Figura 3: Remoção de um melanoma da base da cauda.....	3
Figura 4: Extracção do ovário direito com tumor da granulosa.....	3
Figura 5: Remoção de corpo estranho da face interna da perna.....	3
Figura 6: Modo de acção das micotoxinas.....	19
Figura 7: Efeitos combinados entre as micotoxinas.....	20
Figura 8: Efeito aditivo.....	20
Figura 9: Efeito sinérgico.....	20
Figura 10: Efeito antagonista.....	20
Figura 11: Corpos escleróticos infestantes de várias gramíneas.....	38
Figura 12: Ciclo da doença ergotismo.....	39
Figura 13: Sementes de diversos grãos contaminados pelos corpos de ergot.....	39
Figura 14: Manifestações clínicas de ergotismo gangrenoso.....	41
Figura 15: Imagem da planta <i>P. dilatatum</i> saudável e contaminada por <i>C.paspali</i>	45
Figura 16: Imagem exemplificativa duma “eguada” em sistema extensivo.....	62
Figura 17: Localização da lezíria do Tejo.....	63
Figura 18: <i>P. dilatatum</i> infectado por <i>Claviceps paspali</i>	64
Figura 19: Ataxia locomotora num equino.....	72

Índice de tabelas

Tabela 1: Micotoxinas, fungos produtores, efeitos tóxicos e substratos.....	23
Tabela 2: Micotoxinas produzidas por <i>Aspergillus</i>	29
Tabela 3: Principais espécies toxigénicas de <i>Fusarium</i>	33
Tabela 4: Comparação de métodos de detecção e quantificação de micotoxinas.....	55
Tabela 5: Tecidos onde existe flora bacteriana natural e tecidos estéreis.....	70

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACP – Ácido ciclopiazónico

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AFB – Aflatoxina B

AFG – Aflatoxina G

AFM – Aflatoxina M

DAS - Diacetoxiscirpenol

DON – Deoxinivalenol

ELEM – Leucoencefalomalacia equina

ELISA – Imunoensaio enzimático em fase sólida

FB – Fumonisin

FMV – Faculdade de Medicina Veterinária

GC – Cromatografia gasosa

HPLC – Cromatografia líquida de alta resolução

LC – Cromatografia líquida

LNIV – Laboratório Nacional de Investigação Veterinária

LSD – Lysergic acid diethylamide

MFO – Sistema função oxidase microsomal

MON – Moniliformina

NIV – Nivalenol

OTA – Ocratoxina A

PCR - Reacção em cadeia pela polimerase

PSL – Puro Sangue Lusitano

RNA – Ácido ribonucleico

RT-PCR – Reacção em cadeia pela polimerase em tempo real

Sa/So – Razão esfingamina-esfingosina

TLC – Cromatografia em camada fina

UV – Radiação ultravioleta

ZEA - Zearalenona

PARTE I

1- Relatório de Estágio

A presente dissertação tem como base o estágio curricular na área de clínica de equinos realizado na Luso Pecu, no período compreendido entre 6 de Outubro de 2009 e 15 de Janeiro de 2010 sob a orientação do Doutor José Carlos Duarte, durante o qual foram cumpridas 400 horas práticas, tendo sido as restantes 100 horas completadas sob a orientação do Doutor Nuno Filipe Bernardes em actividades que decorreram na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa e no Hipódromo do Campo Grande, durante os meses de Fevereiro, Março e Abril de 2010. A co-orientação deste estágio curricular estava a cargo do Professor Doutor Miguel Saraiva Lima.

A empresa Luso Pecu, propriedade do Dr. José Carlos Duarte e do Dr. Luís Frágoso, está sediada no Porto Alto e presta serviços há mais de 20 anos em diversificadas áreas de actuação médico-veterinária em benefício de diferentes espécies animais. Relativamente à espécie equina, existe um Centro de Recolha e Congelação de Sêmen (CRCS) que se encontra reconhecido e certificado pela União Europeia para aquele efeito, o qual funciona igualmente como clínica, encontrando-se equipado com material essencial ao diagnóstico e tratamento de diversas patologias. A par disto também se pratica alguma clínica ambulatória pela região. Durante o período de estágio nesta empresa foi possível assistir e participar em procedimentos de diagnóstico e auxiliar nas terapêuticas a instituir, sendo que as actividades desenvolvidas se poderão descrever de acordo com a sua casuística da seguinte forma:

Foi na área da reprodução que se praticaram maior número de intervenções, entre as quais se salientam a colheita de sêmen a garanhões com recurso a uma vagina artificial e posterior congelação do sêmen, o diagnóstico de gestação em éguas através de ultrasonografia e tratamentos hormonais a garanhões como forma de aumentar a libido.

Figura 1: Colheita de sêmen a um garanhão através de vagina artificial, com recurso a um manequim (original)



O segundo campo de acção com mais casos registados foi a patologia clínica, que incluiu maioritariamente intervenções ao nível do sistema músculo-esquelético, tais como exames clínicos de claudicação recorrendo a meios complementares de diagnóstico, como sejam o Raio X e a ecografia, realização de infiltrações intra-articulares, tratamento de abscessos, colocação de pensos e resolução de casos de traumatologia; intervenções ao nível do aparelho digestivo, em especial diagnóstico e tratamento de cólicas e, com menor expressão, intervenções na área da dermatologia (tratamento de lacerações, dermatofitíases e reacções alérgicas à picada de insectos), pediatria (tratamento de feridas), oftalmologia (monitorização de abscessos da córnea) e medicina dentária (remoção de dentes de lobo e correcção de pontas dentárias ao nível dos molares e pré-molares).

Figura 2: Drenagem de abscesso na sola do casco



Por último assinalam-se as acções no âmbito da identificação de equinos através da realização de resenhos, colocação de *microchips* no ligamento cervical e colheita de sangue para genótipagem, com o objectivo de solicitar a emissão do certificado de origem (frequentemente designado como “livro azul”) e como parte do protocolo de identificação dos equinos de raça Lusitana, exigidas pela Associação de Criadores do cavalo Puro-Sangue Lusitano para a inscrição no livro genealógico da raça e controlo da paternidade. Realizaram-se ainda acções profilácticas, nomeadamente vacinações e desparasitações de vários animais. Houve ainda a oportunidade de assistir a alguns exames de acto de compra, orquiectomias e outras cirurgias, tais como remoção de um melanoma, extracção de um ovário com tumor da granulosa e de um corpo estranho alojado na face interna da perna, como ilustram as figuras de 3 a 5:

Figura 3: Remoção de um melanoma da base da cauda de um cavalo ruço (original).



Figura 4: Extracção do ovário direito com tumor da granulosa (original).



Figura 5: Remoção de um corpo estranho da face interna da perna esquerda (original).



Relativamente ao tema da dissertação “ataxia em poldros derivada da ingestão de paspalum”, este foi escolhido pelo interesse que me suscitou numa manhã em que praticávamos clínica ambulatória e fomos chamados a uma herdade para analisar a situação de cinco poldros que se apresentavam atáxicos, com tremores e com perda de equilíbrio e coordenação motoras. A associação que fizemos entre a condição dos jovens animais, que anteriormente estavam a campo, e a possibilidade de envolvimento de um “veneno” da pastagem despertou-me curiosidade e decidi que com este tema poderia chamar a atenção para a necessidade de se conhecerem as pastagens, as plantas forrageiras que as integram e de que forma podem representar perigo para os animais, sobretudo para os jovens e inexperientes. Com efeito, a ataxia por Paspalum constitui uma patologia pouco comum, ocorrendo poucos casos, esporádicos e sazonais. Todavia não deixa de ser pertinente transmitir informações e partilhar experiências acerca de temas menos vulgares, mas que de igual modo produzem um impacto negativo na saúde e bem estar animal.

Durante o período de estágio em que acompanhei o Dr. Nuno Bernardes, tive oportunidade de assistir a algumas cirurgias realizadas no Hipódromo do Campo Grande, entre as quais destaco artroscopias, nevrectomia digital palmar e cirurgia correctiva de hemiplegia laríngea; assim como cirurgias realizadas no bloco hospitalar de grandes animais da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) da Universidade Técnica de Lisboa, tais como orquiectomia de um testículo inguinal de um cavalo criptorquídeo, remoção de um sequestro ósseo de um fragmento da fíbula com ossificação, e construção de um flap de conjuntiva para resolução duma úlcera da córnea agravada com prolapso da íris, associada a uma tarsorrafia para protecção do enxerto, num cavalo com história de uveítes recorrentes.

Também acompanhei o Dr. Nuno Bernardes em algumas consultas efectuadas no referido espaço da FMV, nas quais pudemos diagnosticar e tratar um abscesso na sola do casco provocado pela penetração de um corpo estranho, proceder à ecografia duma massa supra escapular inespecífica, realizar diagnósticos de claudicação e proceder a gastroscopias e endoscopias transrectais. Finalmente assisti a diversas aulas no âmbito das actividades hospitalares de grandes animais, nas quais relembrei e adquiri imensos conhecimentos mediante o debate de certos temas, como por exemplo: quais os factores determinantes para o desenvolvimentos de cólicas e seu tratamento, etiologia e fisiopatologia da laminite, anestesiologia em equinos, corte correctivo de cascos com demonstração prática, importância e execução de bloqueios articulares no diagnóstico de claudicação, importância da realização de um exame físico rigoroso e duma história pregressa exhaustiva, revisões de anatomia, entre outros quantos assuntos.

2 – Estrutura da Dissertação

A presente Dissertação, subordinada ao tema “ataxia em poldros derivada da ingestão de *Paspalum*” encontra-se organizada em três Partes. A primeira parte diz respeito a uma breve descrição das actividades desenvolvidas durante o estágio, enquanto a segunda parte é constituída por uma revisão bibliográfica sobre micotoxinas da pastagem, enfatizando conceitos generalistas acerca dos fungos micotoxigénicos, definições e princípios gerais que afectam a produção de micotoxinas, o modo de acção destas, o seu impacto na saúde equina e de que forma a análise laboratorial, o conhecimento dos níveis de tolerância para cavalos e a tomada de medidas preventivas se podem reunir e constituir como uma eficaz gestão de risco. A terceira parte corresponde ao estudo de casos, onde são descritos e interpretados qualitativamente sete casos clínicos de ataxia por *Paspalum*, com o objectivo de apresentar a realidade tal como a viveram os poldros afectados.

PARTE II – Micotoxinas das pastagens: Revisão bibliográfica

1 – Nota introdutória

Etimologicamente o termo micotoxina combina a palavra grega “*Mykes*” que significa fungo, com o termo do latim “*toxicum*”, traduzido como veneno (toxina) (Bullerman citado em Gonzalez, Pinto & Felicio, 2001).

Micotoxinas são compostos biológicos naturais de baixo peso molecular, produzidas pelo metabolismo secundário de fungos, que se desenvolvem numa grande variedade de substratos, especialmente em plantas com grande importância na agricultura (milho, trigo, centeio, entre outras) e pastos para animais (palha, restolho, feno, gramíneas). Algumas micotoxinas apresentam reconhecida actividade tóxica em animais, afectando nomeadamente o fígado, os rins e os sistemas nervoso, endócrino e imunitário, com repercussões significativas na saúde e produtividade animal.

Na natureza existe uma grande variedade de fungos embora somente alguns tenham a capacidade de produzir micotoxinas. Estes podem ser classificados em saprófitas ou endófitas. Os primeiros vivem fora da planta, obtendo nutrientes através desta, sem lhe proporcionarem qualquer benefício; enquanto os segundos vivem dentro da planta e estabelecem uma relação simbiótica com a mesma, ou seja, providenciam-lhe benefícios (tais como torná-la mais resistente à seca e à invasão de insectos) enquanto obtêm nutrientes através dela (Wright, 2005).

Os fungos podem ser encontrados nas pastagens ou nos grãos de cereais em quantidades diferentes no decorrer de cada ano, dependendo das condições ambientais. Assim, estações húmidas são favoráveis ao crescimento fúngico, aumentando o grau de contaminação dos pastos, enquanto as temperaturas baixas potenciam a capacidade de produção de micotoxinas (Wright, 2005).

A principal via de exposição às micotoxinas é através da ingestão de alimentos contaminados, apesar de existirem casos esporádicos de inalação e contacto dermal. A susceptibilidade dos vegetais à infecção fúngica, tanto no campo como durante o armazenamento, aliada a factores ambientais favoráveis (tais como temperaturas relativamente baixas e humidade elevada) poderá conduzir a níveis de micotoxinas elevados na dieta de animais e consequentemente ao desenvolvimento de quadros agudos, que no limite poderão mesmo levar à morte.

A gravidade das micotoxicoses varia em função da natureza da toxina e dos efeitos nefastos que esta é capaz de causar (variabilidade decorrente da própria estrutura química das micotoxinas), da espécie animal atingida, da raça, da idade, do sexo, da condição física, do tempo e via de exposição (Bennet & Klich, 2003)

Tratando-se de contaminantes naturais, não é possível eliminar por completo a sua presença das pastagens, pelo que se enfatizam três estratégias fundamentais para a prevenção das micotoxicoses: prevenir ou reduzir a ingestão de toxinas; proteger o animal contra as toxinas ingeridas; criar animais mais resistentes (Smith & Towers, 2001). Todavia há que ter em conta que a presença de fungos toxigénicos não pressupõe por si só a produção de micotoxinas, pois este acontecimento está condicionado pela existência de condições de temperatura e humidade favoráveis, o que não deixa de representar um risco potencial para a saúde pública e animal (Martins, Martins & Bernardo 2003). Outra noção relevante é a ocorrência de interacções complexas e sinérgicas tóxicas entre diferentes micotoxinas, muitas das quais isoladamente apresentam toxicidade relativamente baixa (Carrillo, 2003).

Com efeito, o papel das micotoxinas das pastagens ao nível de problemas de saúde e produtividade das espécies animais em pastoreio tem adquirido uma importância crescente, especialmente em países onde os sistemas pastoris são largamente implementados, uma vez que conduzem a graves perdas económicas. Ao equino, considerado como uma espécie animal de companhia por excelência, é-lhe atribuído um elevado valor económico, fomentado pelas suas capacidades atléticas e companheirismo. Deste modo as micotoxicoses têm um impacto diferente no cavalo comparativamente às restantes espécies de pastoreio, conduzindo a uma quebra na performance desportiva e reprodutiva, as quais constituem a fulcral perda económica neste caso (Guerra, Martins e Gouveia, 2005).

A abordagem desta dissertação realizar-se-á de uma forma sistemática, começando por enfatizar as determinantes da colonização fúngica, em especial de fungos toxigénicos, em seguida destacando-se os factores que condicionam a produção de micotoxinas, os mecanismos de acção das mesmas e os efeitos nefastos que fomentam o desenvolvimento da micotoxicose. Posteriormente, uma breve referência às micotoxicoses mais importantes no mundo equestre, focando um género de fungo com maior detalhe, o qual é representado no caso clínico assistido e documentado: *Claviceps paspali*

2 – Micotoxinas no mundo equino

Diversas micotoxinas são encontradas por um lado em cereais, tais como no centeio, aveia, cevada, milho e trigo, por outro em pastagens e forragens armazenadas, mediante determinadas condições climáticas. Estes alimentos desempenham um importante papel na dieta equina, pelo que a ingestão dos mesmos quando contaminados com micotoxinas, constitui a principal causa para o desenvolvimento de micotoxicoses em cavalos (*Knowmycotoxins*, 2008).

Existem centenas de micotoxinas conhecidas, embora poucas tenham sido alvo de pesquisas extensivas no cavalo. Pensa-se que este animal possui uma susceptibilidade relativamente maior às micotoxicoses do que os ruminantes, visto que estes últimos têm a capacidade de degradar algumas micotoxinas no seu rúmen. Portanto sendo o cavalo monogástrico, a absorção de micotoxinas após a ingestão de alimentos contaminados encontra-se facilitada (Wright, 2005).

As micotoxinas exercem os seus efeitos por meio de quatro mecanismos primários: Diminuição da ingestão de alimento ou recusa do mesmo; alteração da absorção e metabolismo de nutrientes; distúrbios ao nível do sistema endócrino; e imunossupressão (Osweiler, 2000; Whitlow et al., 1998). Estes efeitos conduzem a sintomas pouco específicos, tais como cólicas, insuficiência renal ou hepática, redução da taxa de crescimento e do ganho de peso médio diário, problemas respiratórios e reprodutivos, e até mesmo morte (Perusia & Rodriguez, 2001). Como estes sintomas poderiam relacionar-se com diversos outros factores, para um correcto diagnóstico da micotoxicose é necessário ter presente o tipo de micotoxina envolvida, o estado de saúde do animal, o sexo, a idade, o grau de exigência do trabalho que leva a cabo e o nível de exposição a que foi sujeito, tudo isto aliado a uma análise detalhada dos alimentos suspeitos e à colheita de amostras representativas. Na verdade as análises micotoxicológicas estão dependentes da representatividade da amostra, do seu estado de conservação e da elaboração de uma história pregressa detalhada, pelo que nem sempre garantem um diagnóstico definitivo, e muitas vezes conduzem a resultados falso-positivos quando a amostra suspeita é mantida sob condições que permitam o crescimento fúngico e produção de micotoxinas após o incidente em investigação (Osweiler, 2000).

Contudo outras dificuldades se deparam para o clínico na altura de diagnosticar uma micotoxicose: por um lado a possibilidade de surgirem sintomas secundários causados por uma doença oportunista que se tenha simultaneamente instalado devido à imunossupressão decorrente (nos cavalos as micotoxicoses aumentam a vulnerabilidade a infecções bacterianas), por outro lado a dificuldade em classificar efectivamente as micotoxinas dada a diversidade de estruturas químicas dos seus componentes, juntamente com o facto de apenas um número limitado destas toxinas ser rotineiramente analisado, e ainda a possibilidade de ocorrerem efeitos crónicos (mediante uma exposição prolongada entre 2 a 3 meses), os quais são efectivamente difíceis de diagnosticar (Perusia & Rodríguez, 2001).

3 – Fungos micotoxigénicos

3.1 – Abordagem generalista ao Reino Fungi

Tradicionalmente considerados como pertencentes ao reino vegetal e muitas vezes confundidos com bactérias, hoje em dia os fungos constituem um reino próprio, denominado Fungi. São seres constituídos por células eucariotas, ou seja, mais complexas do que as células procariotas que caracterizam as bactérias, na medida em que são formadas por um núcleo diferente, rodeado por uma membrana própria, que se encontra geneticamente presente em mais de um cromossoma. Para além disso os fungos possuem mitocôndrias no seu citoplasma, ausentes nas células bacterianas. Todavia não possuem cloroplastos nem clorofila, um pigmento presente em quase todos os vegetais, responsável por obter energia através do processo da fotossíntese, pelo que a sua fonte de carbono é a matéria orgânica que decompõem. Por outro lado, ao contrário das células animais, as células dos Fungos apresentam, junto à membrana citoplasmática, uma parede celular compacta, composta por fibras de quitina. Em suma, estas são as características particulares que distinguem os fungos das restantes formas de vida conhecidas, adicionando-se ainda que estes apenas conseguem obter a energia de que necessitam para o seu metabolismo através da integração de compostos orgânicos do meio externo (Oliveira, 1996).

Os fungos podem ser classificados de duas formas, como seres unicelulares (leveduras) ou como organismos pluricelulares (bolors). Todavia, existem alguns fungos, denominados dimórficos, que podem adoptar alternadamente as duas formas, conforme as circunstâncias em que se encontram. As células integrantes dos fungos multicelulares agrupam-se em número variável, por vezes separadas por septos, de modo a constituírem um filamento tubular denominado hifa, a sub-unidade fundamental do organismo. Efectivamente os bolors são formados a partir de uma hifa que cresce em comprimento, de modo a ramificar-se e

originar novas hifas. Geralmente junto ao substrato estas hifas formam uma rede microscópica de filamentos designada por micelo.

No caso dos fungos saprófitas (vivem fora da planta), é o micelo que se encontra em contacto com o substrato e as hifas promovem uma digestão extra-celular através da libertação de enzimas nesse mesmo substrato, providenciando desta forma os nutrientes de que o fungo necessita (Carter & Wise, 2004). Como exemplos de fungos pertencentes a esta categoria encontramos *Aspergillus*, *Claviceps*, *Stachybotrys*, *Fusarium* e *Penicillium*. Os fungos endófitas, tais como *Balansia*, *Epichloe*, *Acremonium* e *Neotyphodium*, vivem dentro da planta estabelecendo uma relação simbiótica ou de parasitismo com a mesma e dessa forma obtendo o seu alimento a partir do corpo do hospedeiro (Wright, 2005). Para finalizar existe mais uma estrutura a referir na constituição do fungo, o corpo de frutificação, gerado a partir do micelo, que alberga os esporângios e se encarrega da reprodução do mesmo por meio da formação de esporos. Em termos reprodutivos, os fungos podem multiplicar-se assexuadamente por fragmentação, gemiparidade e esporulação, ou sexuadamente quando as condições do meio são pouco favoráveis. Porém o ciclo sexual de muitos fungos não é conhecido, por conseguinte a taxonomia destes baseia-se essencialmente na morfologia dos esporos em termos de tamanho, cor, forma e examinação microscópica, assim como no estabelecimento de relações através da homologia de ADN e da comparação do conteúdo de guanina e citocina (Carter & Wise, 2004). Taxonomicamente o Reino Fungi encontra-se dividido em quatro Filos: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Basidiomycota* e *Ascomycota*. Os fungos produtores de micotoxinas encontram-se maioritariamente na divisão *Ascomycota* (Castillo, 2007).

(...) Características como o tipo de esporos, as estruturas que os originam, e a presença ou ausência de reprodução sexual são utilizadas para definir os principais grupos de fungos. O estudo da ontogenia dos anamorfos (fase asexual) e dos telemorfos (fase sexual) é básico para a identificação, principalmente no que se refere ao género e espécie. Não obstante podem utilizar-se outros caracteres para completar e ajudar a classificar este grupo de organismos. Entre eles destacam-se o estudo de características fisiológicas (crescimento a diferentes temperaturas de incubação, assimilação de substratos), bioquímicas (detecção de actividades enzimáticas), do perfil de metabolitos secundários (micotoxinas), e outras técnicas moleculares, como as que se dedicam ao estudo de ácidos nucleicos (...) como a reacção em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction: PCR*) (...) (Castillo, 2007, p.31, tradução livre)

Em suma os fungos são seres heterotróficos, pois praticam uma digestão extracelular, acompanhada pela produção de enzimas proteolíticas, lipolíticas e glicolíticas. Não são dotados de capacidade fotossintética, o que os condiciona a uma existência saprófita ou parasita. Em termos de sobrevivência, possuem uma resistente parede celular cuja função é prevenir a lise osmótica e proteger de agressões físicas, assim como apresentam a capacidade de reproduzir esporos, os quais promovem uma disseminação aérea de novos fungos e conseguem manter-se viáveis durante vários meses sob condições ambientais adversas (Barceloux, 2008).

A produção de esporos permitiu aos fungos aumentarem a sua taxa de sobrevivência e prolificidade quer pelo facto das suas reduzidas dimensões lhes permitirem elevada disseminação no meio envolvente, quer pela capacidade de se manterem em latência durante meses, aguardando condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento fúngico, para então germinarem (Castillo, 2007).

Estas condições externas ideais variam consoante a espécie de fungo em questão. Por exemplo, é convencional subdividirem-se os fungos toxigénicos em fungos de campo e fungos de armazenamento. Os primeiros, tal como o próprio nome indica, invadem as culturas e necessitam de níveis de humidade elevados (20 – 21%), incluindo-se neste grupo espécies como *Fusarium spp.*, *Alternaria spp.*, *Neotyphodium spp.*, *Claviceps spp.*, *Cladosporium spp.*, *Diplodia spp.*, *Gibberella spp.* e *Helminthosporium spp.* Relativamente aos segundos, estes invadem as forragens e os grãos de cereais (tudo quanto tenha sido submetido a um processo de armazenamento), requerendo uma humidade relativa inferior (na ordem dos 13 – 18%) e usualmente não representando perigo antes da colheita. Neste grupo inserem-se as espécies *Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.* (knowmycotoxins, 2008; D'Mello, 1998).

Em conclusão, os fungos são seres vivos repletos de particularidades e possuem um importante papel na decomposição do material orgânico terrestre e na renovação do ciclo de energia. Estima-se que existam 100 000 espécies destes seres ubiqüitários, o que representa metade da totalidade de espécies existentes no planeta Terra (Barceloux, 2008).

Assumem as mais diversificadas características e capacidades. Alguns conseguem produzir metabolitos secundários, tais como antibióticos, micotoxinas ou compostos orgânicos voláteis. Os antibióticos, isolados a partir do fungo, possuem propriedades bacteriostáticas ou bactericidas, e podem ser utilizados na medicina para o combate a determinadas infecções. Pelo contrário, as micotoxinas não representam qualquer benefício para animais, plantas ou homem, mas sim um risco potencial em termos de saúde pública.

Estas últimas não constituem um factor vital para o fungo, na medida em que não contribuem para a obtenção de energia nem para a síntese de componentes estruturais ou enzimáticos. Representam sim uma vantagem competitiva face a outras espécies de fungos e bactérias (Barceloux, 2008). Todavia nem todos os fungos produzem micotoxinas, somente os toxigénicos, e a produção destas está condicionada pelo tipo de substrato onde estes se instalam: os fungos de campo desenvolvem-se mediante uma perda de vigor da cultura alvo, enquanto os fungos de armazenamento necessitam de condições de humidade e temperatura mais específicas e limitantes (*knowmycotoxins*, 2008).

Na verdade a produção de micotoxinas por parte de fungos toxigénicos, tema chave desta dissertação, é um fenómeno estritamente condicionado pelo clima. Já o desenvolvimento de uma condição patológica decorrente da ingestão ou inalação das micotoxinas por parte do animal depende essencialmente da toxicidade do composto em questão e das resistências oferecidas pelo hospedeiro.

3.2 – Métodos utilizados para detectar fungos toxigénicos

O objectivo destes ensaios é testar a capacidade potencial de uma determinada estirpe de fungos para a produção de micotoxinas em ambiente laboratorial.

3.2.1 – Métodos baseados na utilização de meios de cultura diferenciais

Estes métodos recorrem ao emprego de meios de cultura específicos que favorecem a produção de micotoxinas. Como exemplos destes meios de cultura específicos destacam-se o meio APA (*Aflatoxin Producing Ability*) e o meio CAM (*Coconut Agar Medium*), largamente utilizados para detectar estirpes produtoras de aflatoxinas, apesar da sua sensibilidade nem sempre se demonstrar muito elevada (Castillo, 2007).

3.2.2 – Métodos baseados em técnicas cromatográficas

Estas técnicas de quantificação são amplamente utilizadas na identificação de espécies fúngicas produtoras de micotoxinas, visto que têm revelado maior sensibilidade e são desenhadas para minimizar o uso de meios de cultura, tempos de incubação, dissolventes de extracção, e consequentemente vantajosas quando há necessidade de avaliar um número

alargado de espécies fúngicas. Como exemplos referem-se a cromatografia em camada fina (*Thin Layer Chromatography: TLC*), cromatografia líquida (*Liquid Chromatography: LC*) e a cromatografia gasosa (*Gas Chromatography: GC*). Genericamente, a TLC e LC aplicam-se depois de uma extracção simples a pequenos discos de agar obtidos a partir das culturas de ensaio das espécies em análise (Castillo, 2007)

3.2.3 – Métodos baseados em técnicas imunológicas

As técnicas imunológicas aplicam anticorpos policlonais ou monoclonais, de especificidade intermédia, dirigidos contra antigénios relacionados com as espécies potencialmente toxigénicas (tais como polisacáridos da parede fúngica ou enzimas envolvidas na biossíntese de micotoxinas). O senão destes anticorpos é o facto de poderem conduzir a reacções cruzadas com outras espécies fúngicas devido à falta de especificidade dos anticorpos escolhidos. Ou seja, trata-se duma técnica incapaz de discernir entre estirpes produtoras ou não produtoras de micotoxinas para uma mesma espécie fúngica potencialmente produtora, uma técnica pouco sensível (Castillo, 2007).

Uma das técnicas mais conhecidas e empregues é a técnica de imunoensaio enzimático sobre fase sólida (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: ELISA*) (Castillo, 2007).

3.2.4 – Métodos baseados em técnicas de análise de ADN

De entre todas as técnicas já descritas, as que se baseiam no PCR são hoje em dia as mais utilizadas para detecção de fungos potencialmente produtores de micotoxinas.

Com efeito, no passado gerar grandes quantidades de determinadas sequências de ácidos nucleicos para a análise genética era deveras laborioso, todavia actualmente com a ajuda de modernos equipamentos obtemos em poucas horas imensas cópias de material genético. A amplificação por PCR utiliza como agentes reactivos as quatro bases do ADN (adenina, guanina, timina e citosina, nas formas de nucleósido trifosfato), uma ADN polimerase que funciona a temperaturas elevadas, e um par de oligonucleótidos denominados “*primers*” que são complementares a ambas as extremidades da sequência ADN que se pretende amplificar e que constitui o primeiro passo para dar início à cópia dos fragmentos génicos (Castillo, 2007).

3.2.4.1.5 – RT-PCR (*quantitative real time PCR systems*)

Neste tipo de PCR a quantidade do fragmento amplificado analisa-se a cada ciclo de amplificação, o que significa que a ampliação do ADN é combinada com a hibridação através de sondas e com a emissão de um sinal fluorescente, constituindo um dos últimos avanços em termos de micologia diagnóstica (Castillo, 2007). A grande virtude desta técnica é, efectivamente, a sua sensibilidade (Fontes, C. M., comunicação pessoal, Julho, 27, 2010).

Não obstante, a grande aposta para o futuro serão as tecnologias dos *microarrays* (*biochips*) no que se refere à detecção e quantificação de fungos toxigénicos. Esta tecnologia permite identificar por hibridação a espécie fúngica em análise, assim como comparar simultaneamente a expressão de centenas de genes num curto espaço de tempo, servindo-se para isso de um pequeno recipiente similar a um porta-objectos. A fiabilidade dos ensaios poderá verdadeiramente consolidar-se se forem incluídos fragmentos génicos espécie-específicos, sequências com informação filogenética sobre as espécies potencialmente produtoras de micotoxinas e também informação acerca dos genes considerados essenciais para a biossíntese das micotoxinas (Castillo, 2007).

4 – Micotoxinas

4.1 – Definições e princípios gerais

As micotoxinas definem-se como metabolitos secundários de fungos toxigénicos e caracterizam-se por serem compostos de baixo peso molecular e relativamente não voláteis à temperatura ambiente. Estas não se encontram envolvidas em nenhum processo fisiológico, porém potenciam o aumento dos recursos alimentares para os fungos que as produzem, conferindo-lhes vantagens competitivas face a outros organismos que igualmente disputem o mesmo substrato (outros fungos ou bactérias) (Barceloux, 2008). No entanto, se animais ou homem ingerirem esses substratos contaminados, desenvolvem uma reacção tóxica designada por micotoxicose. A ocorrência de micotoxicose derivada da inalação de micotoxinas é também possível, mas ainda pouco documentada, implicando a transformação de uma microscópica porção de substrato contaminado, de um esporo (que veicule a micotoxina) ou mesmo de algum elemento constituinte do fungo num aerossol. De referir por último que as micotoxinas não penetram a pele intacta (Barceloux, 2008).

Note-se que o termo micose se refere a uma doença infecciosa derivada da replicação fúngica no animal hospedeiro, enquanto o termo micotoxicose diz respeito à doença causada pela ingestão ou inalação por parte do animal dos metabolitos tóxicos produzidos pelo fungo (micotoxinas) (Bennet & Klich, 2003)

Historicamente, a primeira micotoxicose a ser documentada na Europa, ocorreu na idade média e ficou conhecida como “fogo de Santo António” (*St. Anthony’s Fire*). Mais tarde, por volta de 1850, descobriu-se que esta doença se tinha tratado na realidade de um caso de ergotismo, devido ao desenvolvimento de micotoxinas (alcalóides de Ergot) no centeio por parte do fungo *Caviceps purpurea*. Tomou proporções epidémicas em muitas partes da Europa, causando nos seres humanos alucinações, convulsões e gangrena. Posteriormente, em 1948, Freeman isolou a toxina T-2, produzida por *Fusarium spp.*, sobre a qual recaía a suspeita de estar na origem de toxinfecções alimentares fatais na União Soviética durante o último período da segunda guerra mundial (Barceloux, 2008). Porém o interesse na pesquisa de micotoxinas somente foi impulsionado a partir do momento em que foi isolada a aflatoxina produzida pelo *Aspergillus flavus*, causadora do surto de “Turkey X disease”, uma micotoxicose que causou inúmeras mortes em patos e perús na Inglaterra no ano 1960 devido ao consumo de amendoins contaminados pela referida toxina. Desde essa altura muitas mais micotoxinas foram descobertas, tais como tricotecenos, ocratoxina, fumonisinas, zealarenona (Barceloux, 2008).

4.2 - Factores que afectam a produção de micotoxinas

Após o crescimento fúngico no pasto ou na forragem, mediante condições de temperatura e humidade ideais, estão reunidas as circunstâncias essenciais para a produção de micotoxinas (D'Mello, 1998). Naturalmente que acerca desta questão há mais determinantes a enfatizar: Técnicas de cultivo, tempo e práticas de armazenamento, momento da colheita, condições atmosféricas geralmente na ordem dos 13% - 25% de Humidade Relativa e 8°C- 35°C de temperatura, pH do substrato compreendido entre 4 e 8, actividade de água acima de 0.7, e por último mas não menos importante, a presença de estímulos competitivos (outros fungos ou bactérias) no mesmo nicho ecológico (Barceloux, 2008 and Whitlow, Hagler & Hopkins, 1998). Esta última referência nem sempre se considera um verdadeiro determinante à produção de micotoxinas dado que sendo os fungos e bactérias organismos ubiqüitários, na Natureza acabaram inevitavelmente por co-habitar e competir pelos mesmos nichos, de tal forma que em ambiente laboratorial, fungos toxigénicos que cresçam numa monocultura não produzem micotoxinas (Fernandes, 2007).

Os parâmetros anteriores condicionam a produção de micotoxinas por parte dos fungos toxigénicos, por outro lado, a concentração de micotoxinas no meio é influenciada pela natureza do substrato, presença de outras espécies fúngicas, requisitos mínimos de humidade e temperatura, da distribuição geográfica do fungo toxigénico e da existência de micoviroses capazes de afectar a formação de micotoxinas (aumentando ou diminuindo) através de danificação mecânica da sua estrutura e alteração do seu metabolismo (Barceloux, 2008).

Relativamente à toxicidade das micotoxinas, esta varia consoante a biodisponibilidade, a possibilidade de interacções entre as mesmas (resultando em efeitos combinados, sinérgicos ou antagónicos), a quantidade de micotoxinas consumida através da ingestão continuada ou intermitente do substrato contaminado, a idade e peso do animal afectado, assim como o seu estado de saúde, nutricional e equilíbrio fisiológico no decorrer da exposição ao agente tóxico (Cartaz apresentado *in* Biovet Symposium, 2007; Barceloux, 2008).

Finalmente a susceptibilidade para o desenvolvimento da micotoxicose depende da espécie animal atingida, idade, sexo e coexistência de outras patologias adjuvantes da diminuição das defesas imunológicas (Cartaz apresentado *in* Biovet Symposium, 2007).

Efectivamente a relação entre crescimento fúngico, produção de micotoxinas e desenvolvimento de micotoxicose é complexa, pois as condições mais adequadas para o desenvolvimento fúngico não constituem necessariamente as condições óptimas para a

formação de micotoxinas. Por exemplo os fungos do género *Fusarium* proliferam mediante temperaturas na ordem dos 25°C a 30°C sem que se verifique significativa produção de micotoxinas. Todavia, quando sujeitos a temperaturas baixas (próximas da temperatura de congelação) regista-se uma elevada produção de micotoxinas sem haver crescimento fúngico significativo (Whitlow et al, 1998). A este respeito, aplicar fungicidas nas culturas com o objectivo de reduzir a colonização fúngica e por conseguinte a produção de micotoxinas, constitui um factor de stress que leva ao aumento da produção de micotoxinas (Whitlow et al, 1998).

É certo que as variações climáticas associadas a cada ano vão determinar diferentes medidas de crescimento fúngico e produção de micotoxinas, as quais se reflectirão em diferentes graus de qualidade de pasto. Tanto as toxinas produzidas por fungos de campo (que invadem as plantas em vida e persistem estáveis durante o armazenamentos) como por fungos de armazenamento (contaminam as forragens e os cereais) acabam por ter hipóteses de integrarem a dieta dos equinos quer estes estejam em liberdade na pastagem ou resguardados no estábulo, na medida em que não existem procedimentos de descontaminação eficientes. Havendo portanto uma exposição à micotoxina através de alimentos contaminados, o que determinará o aparecimento e a gravidade da micotoxicode serão os factores intrínsecos ao hospedeiro (idade, nível de trabalho, nível de stress diário, equilíbrio nutricional e resistência imunológica), tempo de exposição, concentração e toxicidade do agente agressor. Por exemplo, uma exposição por um longo período de tempo perante uma concentração baixa de micotoxina, poderá repercutir-se em sintomas vagos e inespecíficos, porém se também estiver presente outra micotoxina cujos efeitos sejam sinérgicos aos da primeira, o estado de saúde do animal declinará de forma aguda (*knowmycotoxins*, 2008).

Constata-se então que a micotoxicode resulta dum intrincado jogo de factores que favoreçam o crescimento fúngico, produção de micotoxinas e potenciação da sua toxicidade a par de condições depressoras da resistência animal. De acordo com Castillo (2007) existe uma microflora inicial presente nos vários substratos (plantas, forragens ou cereais) que, na prática, é condicionada por factores cuja influência determinará a selecção e multiplicação de uma parte da mesma. Esses factores poder-se-ão agrupar da seguinte maneira:

Factores intrínsecos que se relacionam com as características químicas, físicas e biológicas do substrato, de entre os quais se destacam a actividade de água e o pH; Factores extrínsecos que envolvem parâmetros ambientais, tais como temperatura, humidade, pressão de oxigénio, composição gasosa atmosférica, e a presença ou ausência de luz; Factores relacionados com

os tratamentos tecnológicos a que o substrato tenha sido submetido, os quais podem ser de carácter físico, químico ou biológico, evidenciando-se os tratamentos a altas temperaturas (físicos) pois podem produzir efeitos letais sobre os microorganismos, não havendo o risco de alterarem a composição química do substrato como acontece nas situações em que se recorre a tratamentos químicos; e por último factores implícitos que se referem às relações de dependência ou competição eventualmente estabelecidas entre os diferentes microorganismos que se encontrem num dado substrato.

“ Estes quatro grupos de factores constituem o mecanismo de selecção que determinará a denominada resistência à colonização do alimento” (Castillo, 2007, p.64, tradução livre)

Não só por meio da alimentação há o risco de contrair uma micotoxicose. As camas feitas de palhas e aparas também constituem um óptimo substrato para o crescimento fúngico e consequente produção de micotoxinas. Contudo é nas situações a campo que a problemática das micotoxicoses parece ser mais significativa (D’Mello, 1998). Com efeito a referida problemática requer uma abordagem diferente na espécie equina comparativamente às restantes espécies de pastoreio. Na realidade o equino não é usualmente criado no sentido de obter rendimento através do seu leite ou carne, mas sim de forma a alcançar uma performance atlética, conformação, temperamento e beleza distintas, de maneira que a sua longevidade é maior e mais protegida (Newman, 2006). Todavia o equino, como ser monogástrico, considera-se mais susceptível que os ruminantes às micotoxicoses pelo facto da absorção dos nutrientes ocorrer antes dos processos fermentativos (D’Mello, 1998). Por outro lado trata-se de um herbívoro muito selectivo, pelo que lhe é fácil identificar plantas contaminadas com fungos devido à diminuição da sua palatibilidade.

De qualquer forma a verdade é que surgem casos significativos de micotoxicoses em equinos, os quais não devem ser desvalorizados, mas sim amplamente estudados e compreendidos (Newman, 2006).

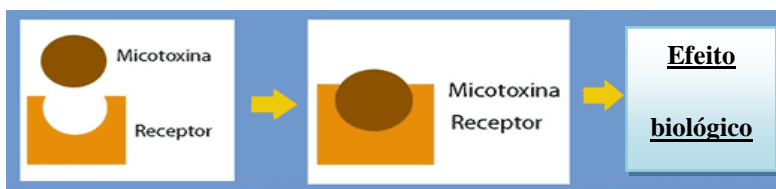
Em conclusão, a colonização fúngica e a produção de micotoxinas são fenómenos que decorrem ao longo de várias etapas – Contaminação do alimento pelo fungo micotoxigénico, germinação de esporos fúngicos, crescimento do micelo fúngico e finalmente produção e acumulação das micotoxinas nesse mesmo substrato. Estas etapas encontram-se condicionadas por diversos factores e os parâmetros ideais diferem consoante a espécie fúngica que se considere (Castillo, 2007).

Regra geral, a micotoxicose constitui uma doença difícil de diagnosticar pelo facto dos sintomas se assemelharem em muito àqueles causados por doenças bacterianas e também por serem bastante inespecíficos e diferentes consoante a micotoxina em causa. É comum verificar-se diminuição da taxa de crescimento, redução do apetite, perda da forma física, cólicas, problemas respiratórios, hipersensibilidade, diminuição da fertilidade, imunossupressão, lesões cerebrais, disfunções neurológicas, insuficiência renal e hepática (*knowmycotoxins*, 2008).

4.3 – Modo de acção das micotoxinas

As micotoxinas consideram-se substâncias citotóxicas capazes de danificar estruturas membranares e interferir na síntese celular de proteínas, ADN e RNA. A sua estrutura química determinará o seu modo de acção e conseqüentemente as interacções bioquímicas estabelecidas com o receptor hospedeiro, através das quais se manifestarão os efeitos biológicos tóxicos (D'Mello, 1998).

Figura 6: Modo de acção das micotoxinas – Consoante a estrutura química de cada micotoxina produzir-se-ão interacções bioquímicas específicas com um receptor orgânico, as quais irão originar um determinado efeito biológico (*in* http://en.engormix.com/MA-mycotoxins/generalities/articles/interpretation-results-mycotoxins-analysis_861.htm).



Do mesmo modo, micotoxinas com estruturas químicas semelhantes poderão interagir com os mesmos receptores e assim originar um efeito biológico potenciado quando ambas estejam presentes. Isto é, surgirão efeitos biológicos combinados quando as micotoxinas possuam estruturas moleculares similares, quando sejam produzidas pelo mesmo fungo ou quando sintetizadas por fungos da mesma espécie. Estes efeitos biológicos decorrentes da associação de micotoxinas dependem da concentração de cada micotoxina em particular e da sensibilidade do animal afectado, traduzindo-se em sinergismo, adição ou antagonismo (Cartaz apresentado *in* Biovet Symposium, 2007).

Figura 7: Efeitos combinados entre as micotoxinas (*in* http://en.engormix.com/MA-mycotoxins/generalities/articles/interpretation-results-mycotoxins-analysis_861.htm).

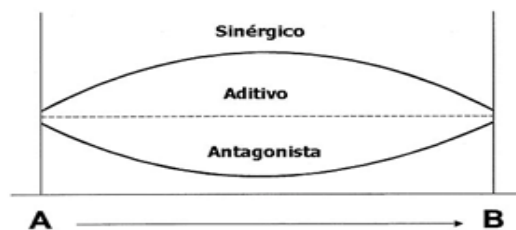


Figura 8: Efeito aditivo : O efeito combinado das micotoxinas X e Y é igual à soma dos efeitos isolados de cada uma delas (*in* http://en.engormix.com/MA-mycotoxins/generalities/articles/interpretation-results-mycotoxins-analysis_861.htm).

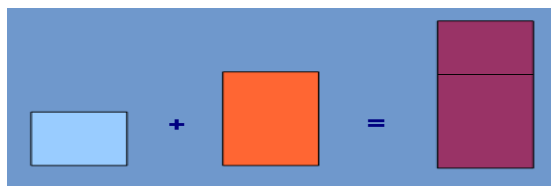


Figura 9: Efeito sinérgico : O efeito combinado das micotoxinas P e Q é maior do que a soma dos efeitos isolados de cada uma delas (*in* http://en.engormix.com/MA-mycotoxins/generalities/articles/interpretation-results-mycotoxins-analysis_861.htm).

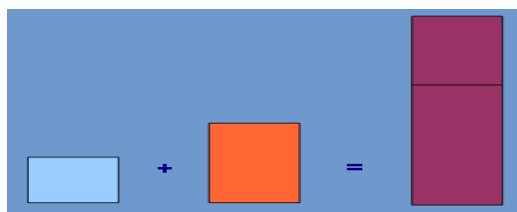
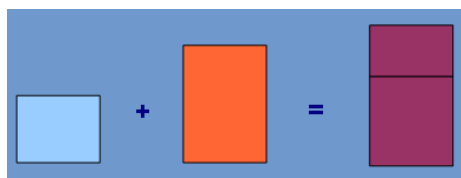


Figura 10: Efeito antagonista : O efeito combinado das micotoxinas A e B é menor do que a soma dos efeitos isolados de cada uma delas mas ainda assim maior que o efeito de A ou B separadamente (*in* http://en.engormix.com/MA-mycotoxins/generalities/articles/interpretation-results-mycotoxins-analysis_861.htm).



Na realidade, os organismos superiores não constituem os alvos específicos das micotoxinas mas parecem ser apanhados no fogo cruzado da guerra bioquímica travada pelos fungos entre si e pelos fungos e bactérias que disputam um mesmo nicho ecológico (D'Mello, 1998). Os animais em pastoreio são sujeitos a uma exposição face às micotoxinas bastante diferente daquela que se observa nas exposições controladas de laboratório, revelando efeitos sobre o sistema imunitário como o mais baixo efeito adverso observado (Jakab et al., 1990). Osweiler (2000) esclarece esta ideia afirmando que não se pode equivaler um estudo baseado na administração oral de determinada dose de micotoxina a um animal à escolha livre desse mesmo animal em pastoreio, pois muitas vezes o animal desiste de ingerir alimentos contaminados devido ao seu desagradável sabor, o que irá limitar os efeitos tóxicos especulados relativamente à ingestão da toxina em questão.

Esses efeitos imunes manifestam-se nos animais pelo aumento da susceptibilidade a doenças infecciosas (Jakab et al., 1990). Por tudo isto poder-se-á afirmar que a maioria das micotoxinas causa um efeito de imunossupressão, apesar do alvo exacto dentro do organismo poder diferir (Smith and Moss, 1985). Aliás, Whitlow et al (1998) chegam mesmo a referir que as micotoxinas exercem o seu efeito mediante três mecanismos primários: (1) alteração do conteúdo nutricional do alimento e alteração da absorção/metabolismo dos nutrientes; (2) mudanças ao nível das funções endócrinas e neuroendócrinas e por fim (3) supressão do sistema imunitário.

A classificação das micotoxinas é realmente um tema controverso na medida em que estas apresentam estruturas químicas e origens biossintéticas diversas, são produzidas por espécies fúngicas diferentes e produzem efeitos biológicos diversificados. Assim,

(...) os clínicos organizam-nas consoante os órgãos afectados, por isso as apelidam de hepatotoxinas, nefrotoxinas, neurotoxinas, dermatotoxinas, entre outros. Biologistas moleculares colocam-nas em grupos genéricos tais como teratogénicas, mutagénicas, carcinogénicas e alergénicas. Os químicos orgânicos preferem classificá-las consoante a estrutura química em lactonas, cumarinas e sesquiterpeno; enquanto os bioquímicos as classificam segundo as origens biossintéticas em, por exemplo, policetides, aminoácido derivadas, etc. Por fim os micologistas optam por associá-las ao fungo produtor (*Aspergillus* toxins, *Penicillium* toxins). Porém nenhuma destas classificações é inteiramente satisfatória. A título de exemplo, a aflotoxina é hepatotóxica, mutagénica, carcinogénica, policetide derivada e *Aspergillus* toxin (...) (Bennet & Klich, 2003, p.500, tradução livre).

Para sintetizar, apresenta-se a seguinte tabela que agrupa e associa as micotoxinas mais frequentes ao respectivo(s) fungo(s) produtor(es), tipo de composto químico que está na origem da sua toxicidade e efeitos nefastos daí resultantes para o organismo hospedeiro, e ainda em que alimentos usualmente estas se poderão desenvolver, os quais constituem substractos de contaminação para humanos e animais.

Tabela 1: Algumas micotoxinas, seus fungos produtores, seus efeitos tóxicos e substratos de contaminação (Delgadillo e Nunes, 1997)

Toxina	Tipo de composto químico	Fungo produtor	Efeito tóxico	Alimento
Aflatoxina	Cumarina substituída	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A.parasiticus</i> , e alguns <i>Penicillium</i>	Hepatocarcinogénica, hepatotóxica e tetratogénica (Síndromes de Reye e Kweshiorkor)	Cevada, trigo, amendoim, sorgo, manteiga de amendoim, molho de soja, esparguete, batata doce, farinha, óleos
Desoxinivalenol (Vomitoxina)	Sesquiterpeno Tetracíclico	<i>Fusarium</i> spp., <i>Trichoderma</i> spp	Emética	Cereais
Fuminisinas	Diéster do ácido propano-1,2,3- tricarboxílico	<i>F. verticilloides</i> (antes conhecida como <i>F.</i> <i>moniliforme</i>), <i>F.</i> <i>proliferatum</i>	Leucoencefalomalácia nos cavalos; edema pulmonar em porcos e hepatocarcinomas em ratazanas	Milho e produtos derivados
Ocratoxina A	Isocumarina	<i>Aspergillus ostianus</i> , <i>A.</i> <i>petrakii</i> , <i>A. aliaceus</i> , <i>A. sclerotiorum</i> , <i>A.</i> <i>sulphureus</i> , <i>A. maleus</i> , <i>Penicillium cyclopium</i> , <i>P.</i> <i>purpurescens</i> , <i>P.</i> <i>viridicatum</i>	Nefrotóxica	Trigo, cevada, aveia, arroz, soja, amendoins, massa, pão, ovos, rins de porco, coração, fígado, carne de galinha
Patulina	Lactona	<i>Penicillium expansum</i> , <i>P.</i> <i>claviforme</i> , <i>P.</i> <i>patulum</i> , <i>P. melinii</i> , <i>P.</i> <i>leucoppus</i> , <i>P. urticae</i> , <i>P. equinum</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>Aspergillus</i> <i>clavatus</i> , <i>A. gigantus</i> , <i>A.</i> <i>terreus</i>	Hemorragias pulmonares e cerebrais, possivelmente neurotóxica	Sementes em germinação e maças
Toxina T-2	Sesquiterpeno Tetracíclico	<i>Fusarium</i> spp., <i>Trichoderma</i> spp	Dermatotóxica e emética	Cereais
Zealarenona	Lactona Macrocíclica	<i>Fusarium graminearium</i> , <i>Mucor</i> , <i>Absidia</i>	Estrogénica	Milho armazenado durante longos períodos de tempo

Toxina	Tipo de composto químico	Fungo produtor	Efeito tóxico	Alimento
Alcalóides do tipo Ergot	Alcalóide	<i>Claviceps purpurea</i>	Neurotóxica (alucinogénica)	Cereais
Citrinina	Lactona Macrocíclica	<i>Penicillium citrinum</i> , <i>P. viridicatum</i>	Nefrotóxica	Frutos secos, arroz, cereais, cevada, trigo
Esterigmatocistina	Xantona Substituída	<i>Aspergillus reguloso</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. versicollor</i> , <i>Penicillium luteum</i>	Hepatocarcinogénica, hepatotóxica	Cevada e aveia
Ácido ciclopiazónico	Derivado indólico policíclico	<i>Penicillium cyclopium</i>	Neurotóxica (efeito convulsivo e tremorgénico), nefrotóxica	Cevada
Ácido penicílico	Lactona α,β insaturada (5 membros)	<i>Penicillium puberulum</i> , <i>P. cyclosporium</i> , <i>P. marteusii</i> , <i>P. thomii</i> , <i>P. suavelens</i> , <i>P. marditti</i> , <i>P. P. baarneuse</i> , <i>Aspergillus quercinus</i> , <i>A. sulphureus</i> , <i>A. ochraceus</i>	Carcinogénico cardiotoxico	Grãos secos e aveia
Austdiol	Lactona Macrocíclica	<i>Aspergillus ustus</i>	Gastro-enterotoxigenica (ulcerogénica)	Cevada húmida
Aversina	Antraquinona Substituída	<i>Aspergillus versicolor</i>	Hepatotoxica	Grãos de cereais e sementes oleaginosas
Citreoviridina	Lactona α,β insaturada (6 membros)	<i>Penicillium citreoviride</i>	Neurotóxica (responsável por paragem respiratória)	Cereais
Esporidesmina	Dipeptídeo Cíclicos	<i>Pithomyces chartarum</i> , <i>Periconia munutissima</i>	Edema cutâneo por fotosensibilização	Pastagens e forragens

Toxina	Tipo de composto químico	Fungo produtor	Efeito tóxico	Alimento
Gliotoxina	Dipeptídeo Cíclico	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Hemorragias e abortos	Especiarias e cacau
Leuteosquirina	Quinona	<i>Penicillium islandicum</i>	Hepatotóxica, carcinogénica	Massa, arroz, cevada, farinhas
Oosporeina	Quinona	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>A. galaucus</i> , <i>Penicillium rubrum</i> , <i>P. purpurogenum</i> , <i>Fusarium porotrichoides</i>	Hemorragias	Farinha e sementes
Penitrem A	Derivado indólico policíclico	<i>Penicillium crustosum</i> , <i>P. granulatum</i>	Neurotóxica (efeito tremorgénico)	Grãos
Psoralenos	Furocumarina Fotoactiva	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Dermatotóxica	Plantas
Roquefortina	Dipeptídeo Cíclico	<i>Penicillium roqueforti</i>	Neurotoxina	Queijo azul, Roquefort e Stilton
Rubrattoxina	Lactona	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>A. galaucus</i> , <i>Penicillium rubrum</i> , <i>Fusarium Sporotrichoides</i>	Teratogénica, hepatotóxica (hemorragias)	Frutos secos e sementes
Rugulosina	Quinona	<i>Penicillium islandicum</i>	Hepatotóxica, nefrotóxica	Arroz, cevada e sorgo
Viridicatina	Derivado de Lactamas	<i>Penicillium viridicatum</i>	Cardiotóxica	Cereais

Em conclusão, segundo referem Bennett and Klich (2003), a gravidade das micotoxicoses varia em função da natureza da toxina (variabilidade decorrente da própria estrutura química das micotoxinas), da sensibilidade da espécie atingida, da raça (umas são mais resistentes do que outras), da idade e do sexo (os mais jovens e as fêmeas apresentam, normalmente, maior resistência), da condição física, da dose e do tempo/via de exposição.

As micotoxinas compreendem uma família estruturalmente diversa de mais de 300 compostos de ocorrência natural, muitos dos quais estão presentes como contaminantes naturais em alimentos para humanos e para animais levando a prejuízos económicos substanciais na agricultura. No entanto, o número de micotoxinas que são detectadas e analisadas com frequência nos géneros alimentícios é relativamente pequeno, cifrando-se entre as 20 e as 30 (Fernandes, 2007).

Embora a colonização fúngica seja um pré-requisito para a produção de micotoxinas, estas não se consideram essenciais para a sobrevivência do fungo produtor, visto que a sua produção é esporádica e surge em resposta às adversidades do meio envolvente, tais como a perda de vigor das plantas decorrente da infestação por insectos ou após danos mecânicos causados pela colheita, períodos de seca, armazenamento de grãos e forragens inadequado, entre outros. Regra geral, a produção de micotoxinas tende a ocorrer de forma fortuita e em regiões geograficamente restritas. Porém a disseminação de esporos fúngicos contendo o agente tóxico e o transporte de grãos e forragens entre países e regiões conduz ao aparecimento de micotoxicoses em áreas sem relatos antecedentes (Poppenga, 2009).

Em todo o caso a correlação entre o grau de contaminação fúngica e a concentração de micotoxinas presente é pequena, pois estas podem persistir nos alimentos livres de fungos graças à resistência perante os factores que condicionam e previnem a subsistência do fungo: humidade reduzida, temperatura elevada e pressão durante o processamento da colheita e tratamentos químicos com ácido propiónico (Poppenga, 2009). Por esta razão quando se pretende avaliar a existência de micotoxinas em determinado substrato é mais viável optar por uma análise micotoxicológica do que por uma análise micológica.

(...) Num alimento, a ausência de espécies potencialmente produtoras de micotoxinas não indica que este não possa conter micotoxinas. Os fungos inicialmente presentes na matéria-prima desse alimento podem ter deixado de ser viáveis depois de um determinado tratamento tecnológico aplicado na sua elaboração (por exemplo, calor), mas as micotoxinas eventualmente produzidas, devido à sua termorresistência, podem encontrar-se presentes no mesmo. (...) (Castillo, 2007, p.52, tradução livre).

4.4 – Micotoxicoses no equino

A presença de fungos toxigénicos não pressupõe por si só a produção de micotoxinas, pois esta depende de algumas condições favoráveis em termos de temperatura e humidade. No entanto a presença de fungos toxigénicos implica um risco potencial para a saúde pública e animal (Martins et al., 2003).

Na literatura encontram-se descritos numerosos casos de micotoxicoses em cavalos, muitos dos quais se limitam a observações simplistas em detrimento duma interpretação detalhada dos achados clínicos. A sintomatologia das micotoxicoses merece um lugar de destaque face aos dados analíticos provenientes de estudos e pesquisas controlados, na medida em que as informações recolhidas no campo durante o exame físico permanecem em forte contraste com os registos das investigações laboratoriais que utilizam experiências desenhadas cientificamente (Asquith, 1991).

(...) Estudos experimentais revelam-se “artificiais” visto que o desenvolvimento duma micotoxicose em ambiente laboratorial assume alguma utilidade mas não é representativa das condições que se vivem em pastoreio (...) (Osweiler, 2000, p. 524, tradução livre).

No entanto as observações efectuadas no campo são frequentemente deficientes devido a insuficiente informação e à possibilidade destas se acharem mascaradas por outro processo patológico simultâneo. Todavia aquelas não devem ser desvalorizadas uma vez que constituem uma importante ajuda na interpretação das micotoxicoses equinas de ocorrência natural (Asquith, 1991).

Relativamente à espécie alvo deste trabalho, sem dúvida que o seu mediatismo em eventos desportivos e exposições públicas conduz a uma valorização económica dos seus exemplares, o que implica portanto maior atenção por parte de produtores e detentores no que respeita à prevenção de todos os factores de risco que possam comprometer a vida ou o rendimento destes animais (Guerra, Martins, Gouveia e Bernardo, 2005). Entre múltiplas vertentes que constituem o manejo dos cavalos, o regime alimentar é apontado como um ponto crítico na perspectiva de Guerra et al (2005), pois vários perigos sanitários podem estar associados à alimentação, como é o caso do desenvolvimento de agentes fúngicos, alguns dos quais com potencial toxinogénico, quer na pastagem, em componentes forrageiras ou em rações balanceadas (feitas à base de cereais e servindo como veículo para suplementações vitamínicas, de aminoácidos e minerais). Na opinião de Newman e Raymond (2005) para a espécie equina as micotoxicoses constituem sobretudo doenças agudas e de gravidade

elevada, considerando também o caso de cavalos de desporto e reprodução que ao serem expostos a doses baixas de micotoxinas, poderão ver diminuído o seu desempenho desportivo/reprodutivo, sem que sinais clínicos da doença sejam manifestados.

Em seguida serão abordadas as micotoxicoses que conduzem a uma maior morbilidade no cavalo, as quais se agrupam em três grupos distintos visando uma melhor compreensão em termos da sua ocorrência natural: Micotoxicoses associadas à produção de cereais, micotoxicoses associadas à produção de forragens e por fim micotoxicoses tremorgénicas.

4.4.1 – Micotoxicoses associadas à produção de cereais

4.4.1.1 – Aflatoxina – aflatoxicose

4.4.1.1.1 – Definição e ocorrência

A aflatoxina foi isolada e caracterizada após o surto de “Turkey X disease”, o qual dizimou mais de 100.000 patos devido ao consumo de amendoins contaminados pela referida toxina (Bennett & Klich, 2003). Todas as espécies animais são susceptíveis à patogenicidade desta micotoxina, embora a gravidade dos efeitos biotóxicos possa variar em função da espécie, da dose e da frequência de ingestão (Martins e Martins, 2000).

Define-se como um metabolito tóxico produzido maioritariamente pelos fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius* (Kurtzman, Horn and Hesseeltine, 1987; Martins, Almeida, Marques e Bernardo, 2008), os quais são ubiqüitários na Natureza e ocorrem sobretudo em cereais (em especial no milho), subprodutos de cereais, sementes de proteaginosas e oleaginosas (Lacey, 1986). Por outro lado os seus esporos também podem afectar as plantas, principalmente durante o período de seca e nas áreas danificadas pelos insectos, causando o stress da planta, que favorece a produção de micotoxinas (Reed & Bayly, 1998). Estudos realizados em culturas de milho demonstram que temperaturas compreendidas entre 25°C – 35°C e humidade no solo acima dos 14% aliadas a algum grau de danificação dos grãos favorecem o crescimento dos fungos produtores de aflatoxinas (Luciano et al, 2006).

Ocorrem casos de aflatoxicose um pouco por todo o mundo (Russel et al, 1991), mas é ao nível dos rebanhos leiteiros que se assinalam as maiores preocupações uma vez que a aflatoxina é excretada no leite (Diaz et al, 1997) e pode conduzir ao desenvolvimento de tumores hepáticos, entre outros efeitos nefastos (Martins et al, 2008). A única solução para combater estes contaminantes naturais é baseada na prevenção do crescimento fúngico nos

substratos vegetais, quer durante a fase de campo, quer durante o armazenamento, aliada a uma correcta monitorização das culturas (Martins et al, 2008).

As micotoxinas produzidas pelo *Aspergillus spp.* são um importante contributo na diferenciação das várias espécies fúngicas, conforme ilustra a tabela 2:

Tabela 2: Micotoxinas produzidas pelas espécies de *Aspergillus* mais comuns. As letras B e G referem-se, respectivamente, à fluorescência azul e verde emitidas por estas aflatoxinas sob a incidência de luz UV (*Blue* e *Green*, em inglês). Assim, *A. flavus* produz apenas aflatoxinas B1 e B2, enquanto *A. parasiticus* e *A. nomius* produzem B1, B2, G1 e G2 (Castillo, 2007)

Espécie	AFB	AFG	ACP
<i>A. flavus</i>	+	-	+
<i>A. parasiticus</i>	+	+	-
<i>A. nomius</i>	+	+	-
<i>A. pseudotamarii</i>	+	-	+
<i>A. bombycis</i>	+	+	-

AFB: aflatoxinas B1 e B2; AFG: aflatoxinas G1 e G2; ACP: ácido ciclopiazónico

As aflatoxinas constituem um grupo de aproximadamente 20 metabolitos fúngicos, embora somente as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 sejam vulgarmente encontradas nos alimentos. As aflatoxinas M1 e M2 (hidroxiladas) resultam do metabolismo oxidativo das B1 e B2 no fígado e poderão contaminar o leite e seus derivados (a letra “M” relaciona-se com a palavra *Milk*, em inglês) (Peraica, Radic, Lucic & Pavlovic, 1999).

A distinção entre as micotoxinas B e G efectua-se através da fluorescência que estas emitem sob luz ultravioleta (azul ou verde) após a extracção do alimento suspeito e quantificação por meio de técnicas de cromatografia. Entre todas, a aflatoxina B1 é considerada o composto carcinogénico natural mais potente (Martins, Guerra e bernardo, 2007), daí que muitos países tenham decidido regulamentar os níveis de AB1 nos alimentos e do mesmo modo definir ou propor um nível máximo permissível de AM1 no leite (Martins, Guerra e Bernardo, 2007). Actualmente os limites legais para ocorrência de AB1 nos produtos alimentares varia de estado membro para estado membro, todavia a União Europeia determina que esse limite seja de 5µg/Kg na alimentação animal (Martins, Guerra e Bernardo, 2007).

Quimicamente as aflatoxinas são compostos derivados difuranocoumarinas produzidos por uma via policetónica. Possuem também um anel lactona que os torna susceptíveis à hidrólise alcalina. São rapidamente absorvidos pelo tracto gastrointestinal dirigindo-se para o seu órgão alvo – fígado – onde se unem a macromoléculas tais como ADN e enzimas integradas nos hepatócitos. Neste órgão são sintetizados metabolitos conjugados que tanto podem ser

lipossolúveis como solúveis em água, alguns dos quais iniciam um ciclo entero-hepático de absorção-excreção. As aflotoxinas e seus metabolitos são eliminados através da urina e fezes, processo que leva alguns dias a ser completado (Reed & Bayly, 1998).

4.4.1.1.2 – Sinais Clínicos

A micotoxicose aguda manifesta-se por anorexia, temperatura elevada, frequência cardíaca e respiratória aumentadas, ataxia, depressão, letargia, convulsões, mucosas ictéricas, tensão abdominal e cólica, fezes sanguinolentas, culminando em morte. Geralmente concentrações de aflatoxina nos alimentos superiores a 1 000ppm estão associadas a situações agudas (Manual Merck de veterinária, 2007). Estes sinais foram experimentalmente examinados em cavalos aos quais foi administrado aflatoxina nas doses de 2 a 5mg/kg. Verificou-se neste estudo que a sintomatologia surgia cerca de 4h após o momento da infecção e a morte ocorria entre 68h e 32 dias (Reed & Bayly, 1998).

(...) As espécies animais que dispõem de arsenais enzimáticos capazes de reduzir a aflatoxina B1 a aflatoxicol são susceptíveis de ser atingidas por formas agudas de intoxicação. A relação entre os teores da aflatoxina B1 reduzida e da oxidada, num determinado parênquima, pode servir de indicador útil para caracterizar a situação de toxicidade aguda (...) (Smith e Moss, 1985 citado em Martins & Magalhães, 2007, p.315).

A concentração de toxina na dieta necessária para o desenvolvimento duma aflatoxicose crónica em cavalos ainda não foi estabelecida. Noutras espécies observa-se anemia, anorexia, depressão, pêlo eriçado, grau de icterícia suave e ocasionalmente aborto (Reed & Bayly, 1998).

4.4.1.1.3 – Fisiopatologia

O órgão alvo das aflatoxinas é o fígado e estas classificam-se como hepatotóxicas. A aflatoxina B1 liga-se às macromoléculas de ADN e inibe a síntese de RNA, o que implica igualmente a inibição da síntese de enzimas e proteínas intracelulares nos hepatócitos. De facto as alterações ao nível da síntese proteica e a mobilização lípida levada a cabo pelas aflatoxinas constituem os fenómenos base para a necrose hepática e degeneração lipídica do fígado (Reed & Bayly, 1998). Efectivamente o fígado é o órgão mais afectado, sendo que perante doses altas de biotoxina origina-se uma severa necrose hepatocelular, enquanto doses baixas e prolongadas ocasionam redução de taxa de crescimento e dilatação do fígado com

desenvolvimento de cirrose e carcinoma dos ductos biliares (Manual Merck de veterinária, 2007), pois as aflatoxinas são componentes lipossolúveis facilmente absorvidos pelo tracto gastrointestinal e metabolizados no fígado (Diekman and Green, 1992).

Os efeitos citotóxicos, teratogénicos, mutagénicos, carcinogénicos e imunossupressores induzidos pelas aflatoxinas derivam basicamente da afectação do sistema função oxidase microsomal (MFO) quer nos hepatócitos, quer noutras células alvo. As ligações químicas que estão na base dos efeitos carcinogénicos e mutagénicos das aflatoxinas traduzem a grande afinidade destas para com os ácidos nucleicos e consistem principalmente em ligações do tipo covalente com o átomo de azoto 7 da base guanina (Martins & Magalhães, 2007).

4.4.1.1.4 – Diagnóstico e tratamento

A aflatoxicose é uma doença representada maioritariamente por sinais pouco específicos, daí que o diagnóstico definitivo seja complicado. Os equinos intoxicados experimentalmente registaram um aumento nas concentrações plasmáticas de AST, ALT, GGT, iditol desidrogenase e arginase; assim como hipoglicémia, hiperlipidémia, linfopénia e aumento das proteínas totais (Reed & Bayly, 1998).

O exame anatomopatológico revelou graus de degenerescência e necrose hepática variáveis, hiperplasia do ducto biliar, fibrose periportal, petéquias em diversas vísceras e enterite hemorrágica. Em alguns casos também se verificou encefalomalácia de ambos os hemisférios cerebrais, degeneração do músculo cardíaco, infiltração gorda do rim, e finalmente hemorragias subcutâneas e intramusculares (Reed & Bayly, 1998).

Embora os metabolitos tóxicos produzidos pelo género *Aspergillus* emitam fluorescência sob a incidência de luz ultravioleta, a presença de fluorescência em amostras de alimento suspeitas não corresponde a um sinal patognomónico para diagnóstico de aflatoxicose.

Para um correcto e efectivo diagnóstico há que recorrer a técnicas específicas de cromatografia a partir duma amostra de alimento suspeita – cromatografia em camada fina e, recentemente, cromatografia líquida de alta resolução (Reed & Bayly, 1998; Martins & Magalhães, 2007).

Relativamente ao tratamento, recorre-se a uma terapêutica sintomática aliada à remoção imediata dos alimentos suspeitos caso estes ainda estejam a ser fornecidos aos animais. Recomenda-se também uma dieta de fácil digestão, baixa em calorias e equilibrada em conteúdo proteico daí em diante. A suplementação vitamínica é aconselhável. Nos casos agudos é indicada a administração via oral de carvão activado.

De qualquer forma a medida mais importante a implementar é a prevenção mediante a escolha de um local adequado para armazenar os grãos de cereais de forma a desencorajar o crescimento fúngico nesses substratos (Reed & Bayly, 1998).

4.4.1.2 – Fumonisinias – leucoencefalomalacia equina

4.4.1.2.1 – Definição e ocorrência

As fumonisinias são micotoxinas produzidas por fungos do género *Fusarium* (Blandino, 2009) e o interesse sobre estas tem vindo a aumentar a nível mundial por duas razões em especial, devido ao facto das fumonisinias se encontrarem em concentrações mensuráveis no milho e ainda devido ao facto de estudos epidemiológicos realizados as associarem ao cancro esofágico em humanos (Lino, Silva e Pena 2004).

A primeira fumonisina a ser isolada foi a FB1 por Gelderblom et al. (1988) a partir de culturas de *Fusarium moniliformi*. Estes compostos ocorrem fundamentalmente no milho e em produtos à base de milho (Lino, Silva e Pena, 2007). É de notar a existência duma grande variedade de estirpes de *Fusarium*, as quais são produtoras de um vasto número de diferentes micotoxinas (Fernandes, 2007), conforme elucida a tabela 3.

Os tricotecenos são um grupo de metabolitos secundários com uma estrutura básica semelhante e encontram-se descritos mais de 45 tipos diferentes, agrupados em dois grupos consoante a sua estrutura química: tricotecenos tipo A, que compreendem as toxinas T-2, HT-2 e diacetoxiescirpenol (DAS); e tricotecenos tipo B que incluem o deoxinivalenol (DON), seus derivados e nivalenol (NIV) (Castillo, 2007).

A zearalenona (ZEA) é um composto anabólico e uterotrópico com actividade estrogénica, considerando-se uma das micotoxinas do *Fusarium* que ocorre com maior frequência nos produtos agrícolas e que será abordada mais detalhadamente adiante (Castillo, 2007).

A moniliformina (MON) desenvolve-se sobretudo nos cereais e as fumonisinias (FB) compreendem um grupo de quinze micotoxinas de estrutura química similar, entre as quais a mais importante é a fumonisina B1, seguida da FB2 (Lino, Silva e Pena, 2007).

Tabela 3: Principais espécies toxigênicas do género *Fusarium* (Castillo, 2007).

Espécie	DON	T-2	HT-2	ZEA	MON	FB
<i>F. acuminatum</i>	-	+	+	-	+	-
<i>F. anthophilum</i>	-	-	-	-	-	+
<i>F. avenaceum</i>	-	-	-	-	+	-
<i>F. crookwellense</i>	-	-	-	+	-	-
<i>F. culmorum</i>	+	-	-	+	-	-
<i>F. chlamydosporum</i>	-	-	-	-	+	-
<i>F. diamini</i>	-	-	-	-	-	+
<i>F. equiseti</i>	-	+	-	(+)	-	-
<i>F. graminearum</i>	+	-	+	+	-	-
<i>F. napiforme</i>	-	-	-	-	-	+
<i>F. nygamai</i>	-	-	-	-	-	+
<i>F. oxysporum</i>	-	(+)	-	-	+	-
<i>F. poae</i>	-	(+)	+	-	-	-
<i>F. proliferatum</i>	-	-	-	-	+	+
<i>F. sambucinum</i>	-	+	-	(+)	-	-
<i>F. semitectum</i>	-	+	-	+	-	-
<i>F. sporotrichioides</i>	+	+	+	(+)	-	-
<i>F. subglutinans</i>	-	-	-	-	+	-
<i>F. verticillioides</i>	-	-	-	(+)	(+)	+

(+) : reduzida percentagem de produção; DON: deoxinivalenol; ZEA: zearalenona; MON: moniliformina; FB: fumonisinas

Na verdade as fumonisinas foram agrupadas em quatro séries e nomeadas por A, B, C e P. As da série B incluem os metabolitos mais activos do ponto de vista toxicológico, em especial as FB1 e FB2, pouco se conhecendo acerca da ocorrência das FB3 e FB4 (Fernandes, 2007). Quimicamente FB1 e FB2 são esteres de ácido tricarbóxico e álcoois polihidricos, apresentando uma estrutura similar à da esfingosina, e por essa razão interferindo no seu metabolismo, bloqueando a biossíntese do complexo esfingosina – esfinganina (Martins et al, 2003), logo perturbando o metabolismo dos esfingolípidos, os quais estão presentes nas membranas celulares desempenhando a função de mediadores do crescimento celular, diferenciação e morte das células. Sendo assim, estas micotoxinas contribuem para uma variedade de consequências a nível celular, como sejam a indução da apoptose e efeitos carcinogénicos (Lino, Silva e Pena, 2004).

No que diz respeito aos equinos, quando estes ingerem milho contaminado por *Fusarium moniliforme* veiculando FB1 desenvolvem uma doença neurológica designada por leucoencefalomalacia equina (ELEM) (Reed and Bayly, 1998). Esta doença apresenta um carácter sazonal (fim do Outono e início da Primavera) e regra geral não afecta cavalos com menos de um ano de idade (Higgings and Wrigth, 1995). A invasão do milho por *Fusarium* ocorre quando a planta sofreu algum tipo de stress no período de crescimento, como por exemplo calor excessivo, seca, chuvas intensas, infestação por insectos, ou até mesmo uma combinação de alguns destes factores (Malikides, Hodgson and Rose, 2000).

Desde 1981 que foram reportados surtos de ELEM em diversas regiões do globo, tais como América do Sul, China, Grécia, França, Egipto, África do Sul e Alemanha e USA (Morgavi and Riley, 2007). Estes surtos incentivaram a investigação, e no final do ano 1988 foi provado que efectivamente a FB1 constituía o agente etiológico da referida doença (Stockman-Juvala, 2007), através de estudos realizados por Marassas et al (1988), os quais conseguiram reproduzir a ELEM no cavalo por meio da administração oral e intravenosa de FB1 purificada, assim como por meio do fornecimento de milho contaminado naturalmente.

4.4.1.2.2 – Sinais Clínicos

Registam-se dois síndromes associados à intoxicação por FB1: síndrome neurotóxico e síndrome hepatotóxico, no entanto o síndrome clássico e mais frequente é o neurotóxico. Este caracteriza-se inicialmente por uma descoordenação, caminhar “à deriva”, anorexia intermitente, letargia, depressão, cegueira e “*head-pressing*” (Reed and Bayly, 1998). O Manual Merck de veterinária (2007) acrescenta ainda o registo de apatia, sonolência, paralisia faríngea, marcha em círculos e andar cambaleante, sendo que estes sinais manifestam-se ao fim de 1 ou 2 dias, apesar deste período de tempo poder oscilar entre apenas várias horas ou várias semanas. Numa segunda fase verifica-se hiperexcitabilidade, extrema agitação, transpiração profusa e delírio. Convulsões clónicas ou até mesmo algum grau de recuperação podem anteceder a morte do animal. Após o desenvolvimento deste quadro agudo já se reportaram alguns casos de recuperação, porém muitos dos cavalos revelaram sequelas em termos de deficits neurológicos (Reed and Bayly, 1998).

Acerca da síndrome hepatotóxica, esta exprime-se através de icterícia, petéquias nas mucosas, edema dos lábios e nariz, respiração abdominal e cianose (Reed and Bayly, 1998).

Segundo a World Health Organization ([WHO], 2000) a dose oral mínima para induzir a ELEM num cavalo corresponde a 15-22 mg/kg de FB1 presente na dieta (8 a 10 ppm),

contudo considera-se um risco potencial para o desenvolvimento da doença ingestões a partir de 10mg/kg. Destaca-se também o facto da ELEM surgir preferencialmente em animais mais velhos, no decorrer de três a quatro semanas mediante um consumo diário de alimento contaminado, ou então surgindo de uma forma abrupta e fatal ao fim de 2 ou 3 dias, pelo que muitas vezes os proprietários encontram os seus animais mortos sem que se tenham assinalado sinais premonitórios (Reed and Bayly, 1998).

4.4.1.2.3 – Fisiopatologia

As fumonisinas são compostos citotóxicos que inibem a síntese proteica e de ADN, ou seja, promovem o stress oxidativo, induzem a fragmentação do ADN e interrompem o ciclo celular (Creppy et al citados por Lino et al, 2004). O síndrome de ELEM é fatal e aparentemente ocorre apenas em cavalos e espécies relacionadas, registando uma taxa de mortalidade que varia entre 40% a 84% (Higgings and Writh, 1995). Na base de todos os problemas clínicos aferidos encontra-se a inibição da biossíntese dos esfingolípidos, uma vez que estruturalmente as fumonisinas são análogas das bases esfingóides. Deste modo, as fumonisinas podem alterar a concentração e a proporção entre a esfinganina e a esfingosina, diminuindo a biossíntese de esfingosina e acumulando esfinganina (Riley *et al.*, 1994; Turner *et al.*, 1999; Desai *et al.*, 2002; Carratù *et al.*, 2003 citados por Lino, Silva e Pena, 2004).

Fisiologicamente ocorrerão repercussões ao nível do sistema nervoso através da liquefacção da substância branca do cérebro (Lino, Silva e Pena, 2004), processo necrótico que normalmente é unilateral, mas também pode ser assimetricamente bilateral (Manual Merck de Veterinária, 2007). Simultaneamente poderão verificar-se lesões degenerativas ao nível do cerebello e da medula espinhal (Reed and Bayly, 1998). Relativamente às lesões hepáticas, estas assemelham-se às que se registam para os casos de aflatoxicose (Manual Merck de Veterinária, 2007), todavia revelam-se geralmente menos pronunciadas: ligeiro aumento de tamanho, cor amarelo-acastanhada, e presença de nódulos irregulares dispersos por todo o parênquima (Reed and Bayly, 1998).

O mecanismo que determina o desenvolvimento de um ou de outro síndrome encontra-se porém pouco elucidado. Foi sugerido que as lesões cerebrais eram induzidas por pequenas quantidades de FB1 ingerida a partir de milho contaminado, ingestão essa prolongada no tempo, enquanto as lesões hepáticas seriam determinadas por ingestões de FB1 elevadas mas durante um curto espaço de tempo (Reed and Bayly, 1998).

Para finalizar destacam-se apenas as observações realizadas por Smith et al (2002) no que respeita a uma possível associação entre a doença neurológica e as concentrações de esfingosina e esfinganina presentes no soro e no miocárdio, a par com o declínio da função cardiovascular em cavalos com ELEM, sugerindo que a FB1 tem capacidade para induzir insuficiência cardiovascular, e que este facto poderá constituir um dos contributos principais para o desenvolvimento de ELEM.

4.4.1.2.4 – Diagnóstico e tratamento

No diagnóstico da ELEM é essencial estabelecer o paralelismo entre os achados clínicos e a história dos animais, concedendo especial atenção à questão do maneio alimentar (Reed and Bayly, 1998). Na maioria dos casos verifica-se aumento dos níveis séricos de enzimas hepáticas (bilirrubina, AST, GGT e LDH) (Sinha and Cox, 1995). Analisando o fluido cefalorraquidiano poder-se-ão assinalar alterações que incluem aumento dos valores de proteína total, todavia perante uma suspeita de ELEM, fundamentada por sinais clínicos correspondentes aos descritos e dieta que inclua milho, o melhor meio para um diagnóstico definitivo será proceder a análises de amostras alimentares para detecção da FB1 (Reed and Bayly, 1998), tal como será descrito à frente. Caso se verifique a morte de algum animal na exploração os dados recolhidos por meio de necropsia podem confirmar o diagnóstico (liquefacção da substância branca do cérebro) (Sinha and Cox, 1995).

Por outro lado, um aumento serológico do rácio esfinganina – esfingosina talvez represente, segundo Poppenga (2009), a manifestação mais precoce da doença, porém poucos laboratórios estão aptos para realizar essa avaliação. A razão esfinganina-esfingosina (Sa/So) considera-se um bom biomarcador de exposição às fumonisinas, sendo também útil para a monitorização dos efeitos biológicos das mesmas, todavia são necessárias mais provas científicas para que esta razão se considere um biomarcador seguro na exposição humana às FB (Lino et al., 2007).

(...) a observação de que a FB1 e a FB2 inibem a enzima N-aciltransferase na biossíntese *de novo* de esfingolípidos levando a uma acumulação de esfinganina, uma base esfingóide, e a um aumento da razão esfinganina-esfingosina sugere que o valor desta razão poderá ser um biomarcador potencial e preferencial relativamente à exposição às FB (...) (Lino et al., p. 9).

Acerca do tratamento, na verdade este apresenta apenas um carácter de suporte pois não existe nenhum tratamento ou antídoto efectivo no combate à ELEM (Poppenga, 2009). O tratamento de suporte aconselha a sedação de cavalos que estejam demasiado agitados de forma a evitar que a integridade física do animal e do tratador sejam ameaçadas. Seguidamente Mannitol ou DMSO poderão ser administrados na tentativa de reduzir o edema cerebral, e da mesma maneira poderão ser veiculados laxantes com o propósito de eliminar as toxinas que ainda permaneçam no aparelho digestivo. A utilidade dos laxantes provavelmente será mínima caso a doença não corresponda a um quadro agudo (Reed and Bayly, 1998).

A par de tudo isto é deveras importante que o alimento contaminado seja imediatamente removido da dieta dos animais: para os animais estabulados basta cessar o fornecimento dos cereais contaminados e relativamente aos animais a campo há que colocá-los noutras pastagens onde não possam ter acesso à pastagem de milho contaminado (Reed and Bayly, 1998). Por outro lado, conforme elucida o Manual Merck de Veterinária (2007), a toxina encontra-se sobretudo nos grãos danificados ou malformados, pelo que a limpeza do grão para extracção destas sementes reduz consideravelmente a concentração de fumonisina.

No entanto, animais que demonstrem sinais neurológicos mais exuberantes certamente foram atingidos por lesões cerebrais irreversíveis, pelo que o prognóstico é muito reservado e a eutanásia será uma hipótese a ter em conta. Os casos que apresentem síndrome hepática são menos frequentes mas o prognóstico é favorável (Poppenga, 2009).

4.4.2 – Micotoxicoses associadas à pastagem e à produção de forragem

4.4.2.1 – Alcalóides da cravagem do centeio (ergot) – ergotismo

- intoxicação por festuca

4.4.2.1.1 – Definição e ocorrência

A micotoxicose causada pelos alcalóides de ergot designa-se por ergotismo e a sua distribuição é mundial. A maioria das espécies são susceptíveis, nomeadamente animais em pastoreio, pois o fungo produtor destas micotoxinas, *Claviceps purpurea*, ataca especialmente plantas forrageiras, invadindo os ovários em desenvolvimento das suas flores (Manual Merck de Veterinária, 2007; Reed and Bayly, 1998). Adicionalmente este fungo também está apto a contaminar grãos de cereais tais como centeio, trigo, tritcale, cevada e aveia (Poppenga, 2009). É ao nível do corpo esclerótico do *Claviceps spp.* que são armazenadas quantidades variáveis de alcalóides. Porém antes do desenvolvimento desses corpos escleróticos (ou

corpos de Ergot), o fungo causa uma aparência muito característica na planta, ao nível das espigas, designada “orvalho de mel” (“*honey dew*”) que consiste numa secreção amarelada e pegajosa segregada pelo microorganismo. (McMullen and Stoltenow, 2002; Bogo and Boff, 1997).

Trata-se portanto de um fungo parasita que substitui a semente ovárica das espigas por um corpo preto-acastanhado, cuja forma varia consoante a espécie de *Claviceps* em questão e se designa por corpo esclerótido ou “*ergot body*” (Reed and Bayly, 1998). O ciclo da doença ergotismo foi pela primeira vez descrito em 1800. Contudo o estabelecimento de uma relação causal entre as micotoxinas produzidas por este fungo e o desenvolvimento do estado patológico designado por ergotismo gangrenoso, o qual originou terríveis surtos desde a idade média, atingindo pessoas e animais, foi estabelecido muitas décadas antes (McMullen and Stoltenow, 2002).

Figura 11: Corpos escleróticos infestantes presentes no centeio (1), no trigo (2) e noutras espigas de diferentes gramíneas (3) (McMullen and Stoltenow, 2002).



1

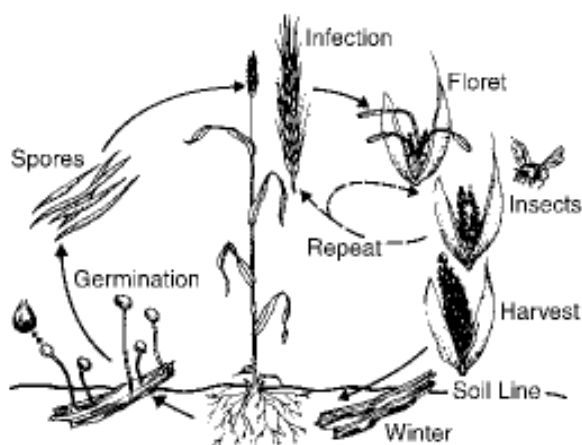


2



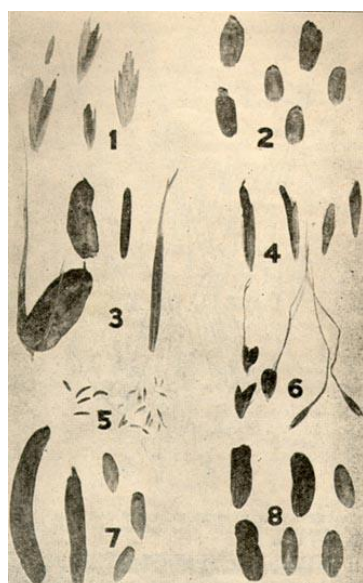
3

Figura 12: ciclo da doença ergotismo (McMullen and Stoltenow, 2002).



O ergotismo tem um carácter sazonal, pois a esclerótida do fungo germina em meados da Primavera/ princípio do Verão, altura em que também são produzidos esporos, que se disseminam via aérea até entrarem em contactos com as espigas das gramíneas. Neste momento ocorre a infecção das culturas e a produção da referida secreção semelhante a “orvalhos de mel”, que acaba por atrair insectos, igualmente veículos para a disseminação do *Claviceps*. Entretanto inicia-se o desenvolvimento fúngico e a substituição do embrião da semente pelo corpo esclerótido, alongado e de coloração negra, que acaba por cair ao solo onde permanece todo o Inverno como uma potencial fonte de novos esporos para o ano seguinte (McMullen and Stoltenow, 2002).

Figura 13: Sementes de diversos grãos exemplificando a diferença morfológica entre sementes contaminadas pelos corpos de ergot do *Claviceps* (aumento de tamanho e deformação) e sementes saudáveis (McMullen and Stoltenow, 2002).



1. Quack grass (*Agropyron repens*)
2. Common wheat
3. Wild rice (*Zizania aquatica*)
4. Brome grass (*Bromus inermis*)
5. Red top (*Agrostis alba*)
6. Feather grass (*Stipa viridula*)
7. Rye
8. Durum wheat

Na realidade, existem duas formas de ergotismo observadas nos animais: O ergotismo nervoso ou convulsivo e o ergotismo gangrenoso (Alderman et al., 1999; McMullen and Stoltenow, 2002; Reed and Bayly, 1998). O principal fungo associado à síndrome gangrenosa é o já referido *Claviceps purpurea*, enquanto a espécie relacionada com a síndrome nervosa é o *Claviceps paspali*, agente patológico que desencadeou a ataxia dos animais que integram o estudo de caso da presente dissertação. Apesar de pertencentes ao mesmo género e partilharem um ciclo de vida idêntico, estes fungos produzem micotoxinas diferentes, que conduzem a efeitos biológicos também diferentes. O *C.paspali* produz micotoxinas tremorgénicas (diterpenóides indólicos tremorgénicos) cujos princípios tóxicos são a paspalinina e os paspalitrems A, B e C (Smith and Towers, 2001) e ainda um alcalóide da cravagem do centeio – LSD (lysergic acid diethylamide); Ao passo que o *C.purpurea* produz apenas alcalóides da cravagem do centeio, tendo sido isolados ao longo do tempo aproximadamente 40 compostos diferentes, destacando-se os mais potentes farmacologicamente: ergonovina, ergotamina, ergotsina, ergocristina, ergocriptina e ergocornina (Reed and bayly, 1998). O Manual Merck de Veterinária (2007) prefere destacar apenas a ergotamina e ergonovina como sendo os mais importantes.

Reed and Bayly (1998) afirmam que os equinos raramente são afectados pelo ergotismo gangrenoso, referindo inclusive que não há registos literários que documentem com rigor e precisão casos clínicos que possam ter existido.

Os mesmos autores consideram que pelo facto da forragem/grãos infectados perderem a sua palatibilidade a ponto de se tornarem alimentos verdadeiramente desagradáveis, isso justifica algum grau de aversão por parte dos equinos. Não obstante tem-se registado que a forma nervosa de ergotismo ocorre mais frequentemente nesta espécie animal.

Porém o síndrome causado por alcalóides da cravagem do centeio efectivamente mais comum nos equinos é a intoxicação por festuca (Poppenga, 2009). Esta doença é provocada pela presença de um fungo endófito, que cresce entre as células da *Festuca arundinacea*, estabelecendo com esta uma associação mutuamente benéfica – o *Neotyphodium coenophialum*, o qual é produtor de paramina, lolitrem B e vários alcalóides da cravagem do centeio (ergot), em especial ergovalina (Smith and Towers, 2001).

4.4.2.1.2 – Sinais Clínicos

O sinal mais característico do ergotismo gangrenoso, tal como o próprio nome indica, é a gangrena das extremidades das patas, orelhas e cauda, manifestando-se inicialmente por uma claudicação que se agrava no decorrer do tempo (Manual Merck de Veterinária, 2007). Estes registos são escassos em termos de medicina equina (Reed and Bayly, 1998). Relativamente ao ergotismo nervoso, este será descrito mais à frente a propósito das micotoxicoses tremorgénicas. Quanto à intoxicação por festuca, Riet-Correa, Mendez, Bergano e Flores (1988), assim como Wright et al. (2001) verificaram dois casos clínicos em éguas gestantes, respectivamente no Brasil e em Ontario, cuja principal manifestação foi a morte fetal no último período da gestação. Também assinalaram o prolongamento da gestação destas fêmeas até cerca de um mês adicional, distócias de parto, agaláxia, colostro com níveis baixos de imunoglobulinas, placentas edematosas e com espessamento da parede e por fim o nascimento de neonatos com pneumonia aspirativa ou até mesmo mortos.

Figura 14: Manifestações clínicas de ergotismo gangrenoso em bovinos: gangrena das extremidades dos membros (McMullen and Stoltenow, 2002).



4.4.2.1.3 – Fisiopatologia

A toxicidade da ergovalina para éguas gestantes está associada à diminuição dos níveis séricos de prolactina e progesterona no último período de gestação: os níveis destas hormonas devem aumentar significativamente 300 dias antes do parto, situação que não se verifica, o que conduz a um edema da placenta e uma gestação prolongada (Wright, 2005). Concentrações de ergovalina acima de 200 ppb provavelmente causarão efeitos reprodutivos nas éguas (Poppenga, 2009). Em bovinos esta patologia é designada “síndrome de Verão” (Manual Merck de Veterinária, 2007) ou “colapso de Verão” (Smith and Towers, 2001), sendo caracterizada por claudicação e necrose das extremidades (cl clinicamente semelhante à forma gangrenosa de ergotismo), hipersalivação e hipertermia quando as temperaturas estão acima dos 25°C, o que leva a crer que nesta espécie a micotoxina funcione como vasoconstrictor (Manual Merck de Veterinária, 2007). Essa vasoconstricção periférica é responsável pela diminuição do fluxo sanguíneo ao nível da pele, conduz à perda de calor corporal quando as temperaturas estão elevadas e por conseguinte ao aparecimento de “stress térmico”, enquanto o arrefecimento das extremidades no Inverno agrava o afluxo de sangue aos tecidos, provocando anóxia tecidual, morte e posteriormente gangrena (Smith and Towers, 2001).

4.4.2.1.4 – Diagnóstico e tratamento

Perante uma suspeita de ergotismo baseada em achados clínicos, é importante procurar no pasto ou feno as evidências da contaminação com os corpos escleróticos do *Claviceps* (Manual Merck de Veterinária, 2007; McMullen and Stoltenow, 2002). A partir desse material afectado poder-se-ão colher amostras para análise laboratorial dos alcalóides de ergot por meio de técnicas cromatográficas abordadas no capítulo 5 – Gestão de risco (Reed and Bayly, 1998). No caso da intoxicação por festuca, como o fungo é endófito não se poderá identificar à vista desarmada, por isso há que ter em conta os sinais clínicos manifestados pelos animais, aliados à presença de festuca no prado ou feno (Manual Merck de Veterinária, 2007).

O tratamento da intoxicação por alcalóides da cravagem do centeio é fundamentalmente sintomático, pois não existe uma terapia disponível (Reed and Bayly, 1998). A única solução será retirar da alimentação feno, palha e/ou grãos contaminados, ou remover os animais da pastagem contaminada. A melhor opção será definitivamente optar por medidas de controlo profiláctico que serão debatidas adiante (McMullen and Stoltenow, 2002).

Reed e Bayly (1998) aconselham como tratamentos paliativos o recurso a antibióticos e analgésicos duma maneira geral, e em particular nos bovinos afectados pelo “colapso de Verão”, a aplicação de antagonistas α adrenérgicos (como por exemplo, acepromazina) para um efeito vasodilatador.

4.4.2.2 – Eslaframina – síndrome salivar ou doença das manchas negras

4.4.2.2.1 – Definição e ocorrência

A eslaframina ou “factor de salivação” é uma micotoxina produzida pelo fungo *Rhizoctonia leguminicola*, que se desenvolve nos caules e folhas duma leguminosa em especial – *Trifolium pratense* (nome comum: trevo violeta) (Perucia & Rodríguez, 2001). Em anos secos e frescos regista-se uma maior proliferação do referido fungo, o qual atinge as leguminosas tanto em vida como após processadas em feno, conferindo-lhes um aspecto característico com machas negras dispersas por toda a planta (Manual Merck de Veterinária, 2007)

Quimicamente trata-se de um indol-alcalóide metabolizado ao nível do fígado e convertido num composto activo, semelhante farmacologicamente à acetilcolina (Perucia & Rodríguez, 2001).

4.4.2.2.2 – Sinais clínicos

Os equinos são espécies muito sensíveis à eslaframina, pelo que, poucas horas após a ingestão do alimento contaminado (cerca de 5 a 6 horas), manifestam salivação excessiva, lacrimejo, poliúria, diarreia, bradicárdia, bradipneia e possibilidade de desenvolvimento de cólicas (Poppenga, 2009). A morbilidade desta doença é alta, porém a probabilidade do animal morrer é reduzida (Manual Merck de Veterinária, 2007). Perusia & Rodríguez (2001) verificaram em algumas vacas o surgimento de tumefacções nas pálpebras e noutras zonas da face, assim como de espasmos na musculatura lisa do esófago com consequente timpanismo gasoso.

4.4.2.2.3 – Fisiopatologia

A eslaframina bioactivada no fígado (indol substituído) constitui um metabolito com actividade colinérgica, por conseguinte os sinais clínicos manifestados resultam da estimulação dos receptores muscarínicos (Poppenga, 2009).

4.4.2.2.4 – Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico baseia-se fundamentalmente no registo dos sinais clínicos e na observação de manchas negras nas folhas ou no caule dos trevos vermelhos. A detecção química de eslaframina na forragem é uma ajuda adicional para a confirmação do diagnóstico definitivo desta patologia (Manual Merck de Veterinária, 2007). Poppenga (2009) destaca a importância de se elaborar uma lista de diagnósticos diferenciais que inclua a intoxicação por organofosforados (devido ao seu efeito parassimpaticomimético), traumatismos na cavidade oral ou presença de corpos estranhos, glossítes e estomatites.

Em termos de tratamento, poder-se-á recorrer à administração de atropina e anti-histamínicos numa vertente paliativa de forma a aliviar os sintomas gastro-intestinais e a salivação profusa (Perucia & Rodríguez, 2001). Poppenga (2009) defende que embora os sinais clínicos sejam dramáticos, a doença em si não é fatal, daí que os equinos usualmente melhorem assim que são retirados da pastagem ou lhes é retirado o feno contaminado. Todavia a partir do momento em que os sinais clínicos se testemunhem, a administração de atropina ou outras drogas antimuscarínicas não é efectiva.

4.4.3 – Micotoxicoses tremorgénicas

4.4.3.1 – Paspalitremis – ataxia do *Paspalum* ou ergotismo nervoso

4.4.3.1.1 – Definição e ocorrência

Paspalitremis são micotoxinas tremorgénicas produzidas pelo fungo *Claviceps paspali* que parasita plantas do género *Paspalum spp.*, consideradas gramíneas rizomatosas subtropicais de Primavera-Verão. A nível nacional destacam-se as espécies *Paspalum dilatatum* (nome comum: graminheira ou milha), *Paspalum paspalodes* (nome comum: graminhão) e *Paspalum vaginatum* (nome comum: gramão) (Monteiro, A., comunicação pessoal, Julho, 19, 2010).

Figura 15: Imagem da planta *P. dilatatum* saudável (A) e imagem de *P. dilatatum* contaminado pelos corpos escleróticos do fungo *Claviceps paspali* (B) (original).



A



B

Este fungo produz também alcalóides da cravagem do centeio (ergot), alguns dos quais podem ser neurotóxicos, e paspalinina. Quimicamente os paspalitrems e a paspalinina são diterpenoides indólicos tremorgénicos (Smith and Towers, 2001). Segundo o Manual Merck de Veterinária (2007) a toxicidade do *Claviceps paspali* não se atribui aos alcalóides da cravagem do centeio, pensa-se sim que os princípios tóxicos serão os paspalitrems A e B e a paspalinina, pelo que basta uma dose única para se originarem os sintomas e para que estes persistam durante vários dias, desde que a quantidade de *Paspalum* ingerida tenha sido bastante significativa. Da mesma forma, uma exposição prolongada à toxina deteriora gravemente o estado de saúde dos animais, fundamentalmente a sua coordenação motora.

A infecção do *Paspalum* ocorre entre o fim do Verão e início do Outono, quando os dias ainda estão quentes mas um pouco mais húmidos. É no decorrer do mês de Setembro/Outubro que o corpo esclerótico (contendo as micotoxinas) desabrocha (Hopkins, Gill and goddard, 2005), tal como ilustra a fotografia da figura 15 (B). O ciclo de vida deste fungo é muito similar ao do *Claviceps purpurea*, caracterizando-se por um ciclo assexual durante o qual segrega o “orvalho de mel” com o objectivo de atrair os insectos e potenciar a sua disseminação, e por um ciclo sexual que compreende o estado esclerótico e coincide com a floração do *Paspalum*. É neste momento que a ingestão da referida planta representa perigo para a saúde dos equinos e do gado. A espécie mais afectada pela ataxia do *Paspalum* é a bovina, seguindo-se a ovina e a equina (tanto mais afectada é a espécie animal quanto menor for a sua selectividade) (Perucia & Rodríguez, 2001).

4.4.3.1.2 – Sinais clínicos

Os primeiros sinais manifestam-se 10 a 15 dias após a exposição, sendo característicos movimentos pendulares da cabeça e leves tremores dos músculos do pescoço, tronco e extremidades. Se alguém se aproximar do animal observa-se hiperexcitabilidade, sobretudo como reacção a estímulos sonoros. Quando a sintomatologia não é manifesta, os tremores surgem após a excitação forçada do animal (Perucia & Rodríguez, 2001). Hopkins et al. (2005) sugerem o aparecimento dos sintomas dois ou três dias após a introdução dos animais na pastagem contaminada, referindo também que mais de metade da manada poderá revelar estes sinais iniciais. As mortes são raras, a não ser que o animal apresente um elevado grau de descoordenação que motive algum tipo de acidente fatal. O momento em que se iniciam os sintomas depende do grau de contaminação das espigas e dos hábitos de pastoreio dos animais (Manual Merck de Veterinária, 2007).

Com o avançar da doença e a exposição continuada ao agente patológico, os tremores agravam-se (tremores de intenção) ao mesmo tempo que surge ataxia, hipermetria, hiperestesia, marcha rígida e instável com os membros afastados, fasciculações, sonolência, algum grau de priapismo e hipotermia. Quando em decúbito os animais apresentam convulsões tónicas, rigidez muscular e movimentos de pedalar. Porém se não forem importunados tentam erguer-se, persistindo então os tremores (Perucia & Rodríguez, 2001). Isto significa que a excitação ou o stress causa uma exacerbação da sintomatologia e o risco do animal cair em posições inapropriadas, colocando em risco a sua integridade física (Higgings and Wrigth, 1995), de modo que a descoordenação demonstrada poderá ser severa o suficiente a ponto do apreensivo animal ser encarado como perigoso quando necessário tocar-lhe ou manuseá-lo (Hopkins et al., 2005; Manual Merck de Veterinária, 2007). Nalguns casos surgem curtos períodos de diarreia, sudação, salivação e nistagmus. A perda de apetite não se verifica (Perucia & Rodríguez, 2001; Reed and Bayly, 1998).

A ataxia do *Paspalum* é considerada uma doença com elevada morbilidade, porém baixa mortalidade, uma vez que as mortes registam-se sobretudo como consequência de fracturas, quedas em bebedouros, entre outros acidentes de natureza física (Poppenga, 2009). Por outras palavras, esta condição não é realmente fatal, desde que se providenciem medidas de segurança para evitar que o animal se lesione, pois a sintomatologia acaba por resolver-se com o tempo (Higgings and Wrigth, 1995). De acordo com Oehme (2009) esta doença não causa lesões irreversíveis nem deixa sequelas, sendo a recuperação espontânea (primeiros sinais de melhorias aparecem entre 3 – 5 dias) após o abandono do pasto ou da forragem

contaminados. Da mesma opinião são Higgings e Wright (1995), pois declaram não haver mudanças neuropatológicas definitivas observadas em necropsias. Por outro lado Perucia e Rodríguez (2001) registaram um acontecimento relativamente constante: o aumento da quantidade de líquido cefalorraquidiano. Scarratt (2004) afirma que a recuperação completa somente se verifica dentro de um a três meses após o fim da exposição.

4.4.3.1.3 – Fisiopatologia

O mecanismo através do qual os princípios tóxicos do fungo *Claviceps paspali* produzem a sintomatologia nervosa descrita ainda não se encontram devidamente elucidados (Reed and Bayly, 1998). Suspeita-se que a sintomatologia resulte da inibição de neurotransmissores a nível do cérebro e particularmente do cerebelo (Poppenga, 2009; Perucia & Rodríguez, 2001). Segundo Perucia e Rodríguez (2001), a serotonina é o neurotransmissor mais afectado dada a semelhança da sua estrutura química com os estimulantes tipo indol, contudo também a dopamina e a norepinefrina poderão estar envolvidas. Reed e Bayly (1991) destacam um alcalóide da cravagem do centeio – LSD (lysergic acid diethylamide), como sendo o responsável por produzir alucinações através de complexas acções agonistas e antagonistas em diversos neurotransmissores monoamínicos centrais, sobretudo serotonina.

4.4.3.1.4 – Diagnóstico e tratamento

Animais que exibam ataxia, hipermetria, descoordenação e tremores, poderão ter ingerido *Paspalum* infectado com corpos escleróticos de *Claviceps paspali*. Perante uma suspeita deste tipo, em primeiro lugar deve fazer-se uma visita à pastagem e confirmar se aí se encontram corpos escleróticos do fungo a infectar a referida planta e se esta se encontra disponível para os animais a ingerirem. Também se poderá colocar a hipótese do *Paspalum* contaminado ser veiculado na forragem fornecida aos equinos (McMullen and Stoltenow, 2002). Simultaneamente é importante fazer o despiste de outras causas que provoquem os mesmos sinais clínicos, tais como tétano (origina hipertonicidade muscular contínua); tetânia hipomagnesémica (motiva convulsões tónico-clónicas graves); intoxicação por organofosforados (conduz a sinais parassimpaticomiméticos); e ainda outras micotoxinas tremorgénicas (atáxia do azevém) (Perucia & Rodríguez, 2001). A detecção dos paspalitrems e alcalóides da cravagem do centeio na forragem também é outra via que se poderá seguir. No entanto tal teste nem sempre está disponível (Poppenga, 2009), para além de que seria

necessário fazer uma avaliação detalhada no sentido de determinar a quantidade individual de toxinas presentes e a sua respectiva toxicidade (Reed and Bayly, 1998).

Acerca do tratamento, uma vez mais não existe nada de específico. Em termos paliativos, o tratamento de suporte poderá consistir na administração de tranquilizantes, como promacina ou diazepam (Perucia & Rodríguez, 2001; Higgings and Wrigth, 1995) e na administração de carvão activado juntamente com laxantes para acelerar o processo de recuperação (Hopkins et al., 2005). Não esquecer que é primordial afastar a fonte de micotoxinas, seja retirando os animais do pasto parasitado pelo *Claviceps paspali*, ou terminar a administração de forragem que contenha paspalum parasitado pelo mesmo (Scarratt, 2004). A manipulação dos cavalos intoxicados deve ser muito cuidadosa, aconselhando-se o repouso num ambiente tranquilo. Deve ser-lhes fornecida forragem nutritiva, assim como tomar precauções para prevenir o acesso accidental a charcos e terrenos escabrosos de forma a evitar eventuais afogamentos ou traumatismos (Manual Merck de Veterinária, 2007). Higgings e Wright (1995), defendem que, seguindo estes passos, poder-se-á esperar uma resolução espontânea da sintomatologia dentro de umas horas a alguns dias, enquanto Scarratt (2004) diverge, afirmando que a recuperação espontânea demora cerca de um a três meses. Já Hopkins et al. (2005), assim como Oehme (2009) consideram que a recuperação deve ocorrer entre três a cinco dias para a maioria dos animais, mas ocasionalmente esta pode prolongar-se até três semanas.

Finalmente é importante salvaguardar algumas simples medidas de controlo que, sendo levadas a cabo, poderiam prevenir todo este problema de forma eficaz, como por exemplo a rotação de culturas, pastoreio intermitente em cada cercado e o corte da porção superior do pasto de maneira a eliminar as espigas parasitadas (Scarratt, 2004). Também se poderá optar por uma boa monitorização das pastagens e colocar o gado no campo antes das espigas florescerem, uma vez que esta patologia é de cariz sazonal (McMullen and Stoltenow, 2002).

4.4.3.2 – Lolitrems – ataxia do azevém, síndrome “da erva que faz dormir” ou doença “do cavalo embriagado”

4.4.3.2.1 – Definição e ocorrência

Os lolitrems são micotoxinas tremorgénicas produzidas pelo fungo endófito *Neotyphodium lolii* que se desenvolve entre as células da planta hospedeira – *lolium perenne* (nome comum: azevém perene) – mantendo com esta uma associação mutuamente benéfica. Concretamente, o referido fungo produz pelo menos três grupos principais de toxinas: diterpenóides indólicos tremorgénicos, que incluem o lolitrem B e a paxalina; alcalóides ergopeptídicos, em especial a ergovalina; e por fim produzem ainda um composto paramina, que representa a grande vantagem para a planta obtida da associação simbiótica com o fungo, pois a paramina tem aptidão como repelente de insectos (Smith and Towers, 2001).

A ataxia do azevém e a intoxicação por festuca são consideradas as micotoxicoses relacionadas com endófitas mais conhecidas, ocorrendo em qualquer local onde o azevém perene ou a festuca alta sejam as espécies vegetais que predominem no pasto (Smith and Towers, 2001).

A problemática da ingestão desta planta toma maiores proporções no Verão, não só porque as concentrações de toxinas são superiores nesta altura, como também devido à reduzida disponibilidade de erva, facto que estimula os animais a consumir vegetação seca e rasteira, consequentemente a ingerirem a região basal do revestimento do azevém, zona onde os lolitrems se encontram em maiores concentrações (Smith and Towers, 2001).

4.4.3.2.2 – Sinais clínicos

Os cavalos e os veados são muito sensíveis à ataxia do azevém (Smith and Towers, 2001), doença esta de carácter neuropatológico e cujos sinais clínicos usualmente se manifestam 5 a 10 dias após os animais começarem a pastar zonas ricas em azevém perene, sobretudo nos meses de Verão. A sintomatologia é progressiva, surgindo inicialmente tremores musculares, rigidez de movimento e ataxia, verificando-se exacerbação dos sintomas com a excitação ou o exercício (Scarratt, 2004). Na perspectiva de Smith e Towers (2004) a marcha cambaleante é o sintoma mais típico desta micotoxicose e as acções do lolitrem B ao nível dos músculos e nervos são responsáveis pela evolução da sintomatologia, seguindo-se a perda de apetite e a

descoordenação de movimentos. Efectivamente isto poderá levar a problemas secundários, tais como o afogamento dos animais afectados em locais de abeberamento ou a eventualidade de quedas, das quais o animal seja incapaz de se erguer, morrendo devido a ferimentos ou desidratação.

Os sinais clínicos mais severos que se poderão assinalar incluem prostração e rigidez extensora, em todo o caso a fatalidade não é comum. Por outras palavras, a morbilidade da ataxia do azevém pode chegar até aos 100%, porém a mortalidade situa-se abaixo dos 50%, sendo que muitas destas mortes derivam não da micotoxicose em si mas sim de acidentes consequentes à debilidade do animal (Scarratt, 2004).

Para finalizar há ainda que referir um sintoma adicional, relacionado com o facto do endófito do azevém produzir também um alcalóide ergopeptídico semelhante ao produzido pelo endófito da festuca, pelo que quando os animais pastoreiam em dias muito quentes podem manifestar problemas de stress térmico idênticos aos que se verificam na intoxicação por festuca (Smith and Towers, 2001).

4.4.3.2.3 – Fisiopatologia

O lolitrem B e a paxalina originam efeitos de estimulação e inibição do músculo liso e dos vasos periféricos, que podem ser exacerbados pela interacção com outros princípios tóxicos também presentes no *Neotyphodium lolii*, como seja a ergovalina (Smith and Towers, 2001).

In vitro, o lolitrem B revelou-se um potente inibidor da activação dos canais de potássio, contudo a toxicidade deste composto ainda não se encontra claramente definida. Pensa-se que concentrações maiores de 2ppm presentes nas plantas ingeridas conduzam ao aparecimento da sintomatologia nervosa (Poppenga, 2009).

4.4.3.2.4 – Diagnóstico e tratamento

Tal como acontece com outras micotoxicoses tremorgénicas, não se encontram lesões na necropsia que possam ser associadas à doença. Todavia há registos de ser observada degenerescência das células de Purkinje ao nível dos neurónios (Scarratt, 2004). Na verdade para se proceder ao diagnóstico é necessário reunir os dados relativos à história, presença de azevém na pastagem ou ferragem e achados clínicos. Também se poderá verificar

laboratorialmente se a concentração de lolitrem B é efectivamente superior a 2ppm (Scarratt, 2004).

Em termos de tratamento nada mais há a acrescentar do que o já mencionado relativamente à ataxia do paspalum, ou seja, dever-se-ão seguir as mesmas directrizes e retirar os animais da pastagem contaminada o mais rapidamente possível (Scarratt, 2004).

4.4.4 – Outras micotoxicoses

4.4.4.1 – Causadas por tricotecenos

Os tricotecenos são micotoxinas produzidas pelo fungo do género *Fusarium*, nomeadamente pelo *Fusarium tricinctum*. Nas pastagens apenas foram identificados quatro derivados do tricoteceno (num total de 40 existentes) que se designam toxina T-2, deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV) e diacetoxiscirpenol (DAS) (Guerra et al., 2005). No que diz respeito à espécie equina apenas um caso de intoxicação pela toxina T-2 se registou na literatura. Na verdade a toxicidade destes metabolitos em animais de pastoreio ainda não está clarificada (Reed and Bayly, 1998).

As micotoxinas tricotecénicas são extremamente citotóxicas para a maioria das células, incluindo as neoplásicas. O seu mecanismo de acção consiste na inibição da síntese proteica ao nível dos polirribossomas, pelo que afectam a funcionalidade de muitas células do sistema imune, facto este que lhes confere um potente efeito imunodepressor. O quadro clínico apresentado pelos animais afectados inclui estomatite, hiperqueratose com ulceração da porção esofágica da mucosa gástrica, irritação da mucosa do tracto intestinal e hemorragias intestinais, sendo muito típico a recusa do alimento e a longo prazo perda de peso, hipoproteinémia e debilidade geral. Decorrente da acção imunodepressora dos tricotecenos, espera-se uma maior susceptibilidade do animal para contrair infecções de natureza viral, bacteriana ou parasitária. Estas infecções oportunistas poderão mascarar a micotoxicose e dificultar verdadeiramente o diagnóstico. Como para qualquer outra micotoxicose é essencial remover a fonte de toxina (alimento contaminado) para que o animal recupere a saúde, podendo contribuir para tal a administração de anti-inflamatórios como tratamento sintomático apenas (metilprednisolona, prednisolona e dexametasona) (Manual Merck de Veterinária, 2007).

Não obstante, o interesse pelo estudo dos tricotecenos é notório e ao longo dos anos muitas pesquisas têm sido feitas, como por exemplo Johnson, Casteel e Messer (1997) que alimentaram um grupo de éguas não gestantes e machos castrados com cevada contaminada – 36 a 44ppm de DON – enquanto também mantinham os animais na pastagem, com o objectivo de avaliarem o efeito da intoxicação com deoxinivalenol nos cavalos. Os resultados obtidos foram a ausência de qualquer sintomatologia mesmo passados 40 dias, sugerindo portanto que a espécie equina provavelmente não seja susceptível aos efeitos adversos causados pela referida toxina ou talvez a sua microflora gástrica possua a capacidade de a degradar, porém esse mecanismo que torna os cavalos resistentes à toxina ainda não foi verdadeiramente esclarecido. Mais tarde, Raymond, Smith e Swamy (2003) testaram o aparecimento ou não de efeitos nefastos relacionados com a ingestão de tricotecenos, ao alimentarem um conjunto de cavalos estabulados com 5kg de feno e 2,8kg de concentrado que continha para além de 15ppm de DON, 0,8ppm de acetildeoxinivalenol, 0,2ppm de zearalenona e 9,7ppm de um ácido produzido por *Fusarium spp.*, concluindo que ao ser fornecida a ração contaminada o consumo desta por parte dos cavalos diminuía.

Barnett, Mowrey, Hagler, Bristol e Mansmann (1997) do Departamento de Ciência Animal da Universidade de Estado da Carolina do Norte também fizeram uma investigação muito interessante, cujo objectivo era averiguar a existência duma correlação entre a ingestão de DON e o surgimento episódios de cólicas. Analisaram amostras de alimentos fornecidos tanto a cavalos que manifestaram cólicas como a cavalos estabilizados de diferentes proprietários e constataram que DON estava presente em todas as amostras recolhidas dos comedouros dos animais com episódios de cólica (100%) e em 70% das amostras recolhidas dos comedouros dos animais estabilizados. Todavia este efeito causal da relação entre intoxicação por tricotecenos e episódios de cólica ainda não se encontra esclarecido. De qualquer modo assumiu-se um nível máximo tolerável de 2ppm de DON na alimentação total dos cavalos (Wright, 2005).

4.4.4.2 – Causadas por Zearalenona

A zearalenona (ZEA) é um metabolito com actividade estrogénica produzido por fungos do género *Fusarium*, em especial *Fusarium graminearum* (Whitlow et al., 1998). Normalmente ocorre na natureza juntamente com DON, contaminando cereais, feno e palha mediante uma humidade superior a 25% e temperatura elevada seguida dum abaixamento brusco que se mantenha depois constante ou intermitente. Quimicamente é muito semelhante ao 17-

betaestradiol, competindo com este pelos mesmos receptores. Os seus efeitos no gado são bem conhecidos, especialmente na espécie porcina, causando vulvovaginites em porcas. Porém pouco se sabe sobre as implicações da ingestão de ZEA em cavalos. Pensa-se que poderá estar relacionada com falhas reprodutivas de origem desconhecida em éguas, pois *In vitro* demonstrou-se que, concentrações significativas de ZEA em contacto com as células da granulosa dos ovários de éguas cíclicas, induziam a atresia folicular (*Knowmycotoxins*, 2008).

4.4.4.3 – Causadas por ocratoxinas

A ocratoxina mais tóxica e igualmente a mais estudada é a ocratoxina A (OTA). Estas micotoxinas são sintetizadas por fungos filamentosos, destacando-se as espécies *Penicillium verrucosum*, que ocorre em climas frios; e *Aspergillus ochraceus* em climas tropicais e subtropicais (Guerra et al., 2005), os quais se desenvolvem em grãos, alimentos comerciais e leguminosas (Perucia & Rodríguez, 2001).

A OTA ocorre especialmente na cevada e considera-se nefrotóxica para os cavalos quando ingerida em concentrações intermédias, sendo que nos casos agudos a morte pode sobrevir por insuficiência renal aguda. Em concentrações elevadas é hepatotóxica, carcinogénica e teratogénica, para além de possuir um potente efeito imunodepressor. Os sinais clínicos manifestados pelos equinos afectados incluem diminuição do apetite e baixo aproveitamento nutricional dos alimentos, diminuição da taxa de crescimento, fraca performance e aumento da susceptibilidade a infecções secundárias (*Knowmycotoxins*, 2008).

5 – Gestão de Risco

5.1 – Recursos laboratoriais para detecção e quantificação de micotoxinas

A contaminação fúngica dos alimentos conduz a importantes perdas nutricionais e coloca em risco a saúde e produtividade dos animais devido aos potenciais efeitos biológicos que lhe estão subjacentes (Marques & Martins, 2008). Todavia há que ter em conta o facto da presença de fungos nos alimentos não implicar necessariamente a produção de toxinas, visto que este fenómeno é condicionado pela temperatura, humidade, tipo de substrato, qualidade do alimento contaminado, etc.. (Perusia & Rodríguez, 2001). Daí que uma análise micológica não possa substituir uma análise micotoxicológica, mas poderá sugerir quais as micotoxinas que eventualmente poderão estar presentes (Whitlow et al., 1998). Outra noção importante

prende-se com o facto dos valores obtidos no laboratório, relativos à determinação analítica da quantificação de uma micotoxina, não serem rigorosamente exactos na medida em que são afectados por uma incerteza que advém do método, instrumentos, reagentes e pessoal técnico envolvido (Perusia & Rodríguez, 2001). De qualquer forma as pequenas margens de erro inerentes ao método científico em si não são significativas a ponto de desvalorizarem a sua utilidade e fiabilidade.

A determinação da concentração de micotoxinas presentes nos alimentos (grãos, forragem, palha, silagem) deverá por isso obedecer a alguns critérios. Por outras palavras, os métodos analíticos utilizados, que se baseiam especificamente na solubilidade das toxinas em solventes orgânicos polares e na possibilidade destas originarem substâncias que produzam fluorescência, enfrentam uma grande variabilidade de estruturas químicas e propriedades físico-químicas inerentes às micotoxinas, daí que os processos para as analisar variem consideravelmente, mas convirjam no que diz respeito ao protocolo de etapas científicas a seguir: amostragem, preparação da amostra, extracção, purificação, separação, detecção, quantificação e confirmação (Krska and Welzig, 2006). Em primeiro lugar é importante a obtenção de uma amostra representativa, uma vez que as micotoxinas não estão uniformemente distribuídas pelo substrato (Whitlow et al., 1998). Neste sentido, o primeiro passo a realizar será a colheita da amostra em vários pontos e a várias profundidades, a qual deverá ser moída, homogenizada e posteriormente originar uma subamostra (com cerca de 4,5kg). A amostragem e a preparação da amostra constituem etapas consideráveis de erro na identificação analítica de micotoxinas. Idealmente esta subamostra deveria submeter-se a uma secagem (80 ou 90°C durante 3h) para redução da humidade antes de ser enviada para o laboratório. No caso das amostras húmidas estas deveriam ser refrigeradas ou congeladas. Em qualquer dos casos é conveniente evitar as bolsas de plástico, preferindo os sacos de papel no transporte para o laboratório, a não ser que a amostra esteja completamente desidratada, refrigerada ou congelada, pois não se verificando estas condições, o desenvolvimento de diversas colónias fúngicas poderá ocorrer (Manual Merck de Veterinária, 2007). Em Portugal existe a Norma Portuguesa 3256 de 1988 que diz respeito à colheita de amostras em alimentos para animais.

Finalmente, após a chegada da subamostra ao laboratório, esta será extraída e purificada. Seguidamente procede-se à separação, detecção e quantificação por meio de técnicas analíticas das toxinas presentes. As técnicas analíticas disponíveis e mais utilizadas incluem cromatografia de camada fina (TLC), cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), cromatografia gasosa/ espectometria de massa (GC/MS) e imunoensaio enzimático em fase

sólida (ELISA) (Whitlow et al., 1998). Na tabela 4 registam-se as vantagens e desvantagens de cada um destes métodos comparativamente.

Tabela 4: Comparação dos métodos analíticos mais comuns na detecção e quantificação de micotoxinas (Fernandes, 2007).

ANÁLISE	MÉTODO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Cultura de fungos e identificação	Cultura microbiológica; testes de identificação microscópica ou bioquímica	Determina a presença de fungos, mas não necessariamente as estirpes toxigénicas.	Não determina se os fungos encontrados podem ou estão a produzir micotoxinas. Pode levar muito tempo para completar o teste, pelo que pode ser demorada a obtenção de resultados.
	Teste ELISA	Rápido e relativamente barato	Apenas detecta uma micotoxina de cada vez. Normalmente são necessários testes adicionais para confirmar a presença da micotoxina.
Análises Químicas	Cromatografia em camada fina (TLC)	Pode detectar mais do que um tipo de micotoxina	Mais lento do que o teste ELISA. Poderão ser necessários testes adicionais para confirmar a presença da micotoxina. Pode não funcionar tão bem para as rações como para outros grãos.
	Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)	Facilidade em fornecer resultados quantitativos; poderá ser capaz de detectar mais do que um tipo micotoxina.	Pode ser mais caro do que outros métodos de análise. Poderão ser necessários testes adicionais para confirmar a presença da micotoxina.
	Cromatografia gasosa /espectrometria de massa (GC/MS)	Pode identificar a micotoxina sem outros testes adicionais; poderá ser capaz de detectar mais do que um tipo micotoxina.	Mais caro do que outros métodos de análise.

Geralmente os laboratórios providenciam análises para um número limitado de micotoxinas (AF, OTA, DON, ZEA, FB e toxina T-2). No que respeita à detecção de fumonisinas, preferencialmente utiliza-se HPLC e GLC em detrimento de ELISA, pois esta técnica possui a limitação de somente providenciar resultados válidos quando as amostras constituem grãos crus e não processados. Para aflatoxinas é usada uma técnica de selecção baseada na incidência de luz ultravioleta e avaliação da fluorescência reflectida (cor), todavia trata-se

duma técnica imprecisa e que apenas se aplica a este grupo de toxinas. Os alcalóides da cravagem do centeio não são rotineiramente analisados, pelo que usualmente os recursos de quantificação estão disponíveis apenas para a ergovalina e o lolitrem B. Contudo existe outra técnica para avaliação da exposição a estes alcalóides, a qual consiste na utilização de biomarcadores de exposição para monitorizar o edema placentário por ultrasonografia de éguas nos últimos 30 dias de gestação, aliado a análises sanguíneas de cinco em cinco dias para monitorização da concentração de progesterona durante este período. Assim, perante concentrações de progesterona abaixo dos 15 ng/ml coloca-se a suspeita de intoxicação por alcalóides de ergot e abaixo dos 5ng/ml a suspeita de intoxicação por lolitrem B. O grande inconveniente desta técnica é o facto de ocorrerem variações significativas de fêmea para fêmea e de cada fêmea em dias diferentes (Wright, 2005).

Em suma, os progressos apurados na instrumentação e análise de micotoxinas têm permitido o desenvolvimento de métodos mais eficazes e com limites de detecção cada vez mais baixos, assim como de mais fácil e rápida execução, o que evidentemente constitui uma mais valia em termos de diagnóstico na medida em que possibilita confirmar suspeitas e agir de forma mais célere e eficiente (Krska and Welzig, 2006).

5.2 – Micotoxinas: níveis de tolerância para equinos

As concentrações de micotoxinas expressam-se em $\mu\text{g/kg}$ ou em ppm, sendo que estas pequenas quantidades actuam de forma cumulativa, pelo que os seus efeitos biológicos tanto podem manifestar-se mediante um quadro agudo como cronicamente, passados meses ou anos após a exposição (especialmente para micotoxinas mutagénicas) (Carrillo, 2003). Em equinos as micotoxinas são sobretudo conhecidas pelo facto de provocarem doenças agudas de elevada gravidade (Newman and Raymond, 2005).

Entre os factores a considerar no estabelecimento dos limites máximos para a ocorrência de micotoxinas nos alimentos há a destacar a distribuição heterogénea da micotoxina no substrato; as limitações inerentes ao método analítico eleito; avaliação dos riscos e do potencial tóxico; e a disponibilidade dos alimentos contaminados (ou com probabilidade de virem a ser contaminados) para os animais (Carrillo, 2003).

Todavia a falta de investigação, as diferentes sensibilidades demonstradas pelas várias espécies animais, as limitações associadas às técnicas analíticas, o grande número de micotoxinas sem limites máximos definidos, as interacções com outras micotoxinas e a

influência do stress ambiental e de manejo constituem factores que dificultam o estabelecimento de níveis de segurança micotoxicológicos. Na verdade a contaminação natural das culturas revela um potencial tóxico maior do que o existente nos alimentos concentrados contaminados com o mesmo nível de uma micotoxina pura. Pensa-se que este acontecimento está relacionado com a possível presença de várias micotoxinas no campo que interactuem entre elas, ou com a presença de micotoxinas desconhecidas (Whitlow et al., 1998). Num estudo desenvolvido por Guerra et al, (2005) verificou-se que as rações destinadas aos equinos em Portugal não apresentavam perigos de natureza microbiológica nem toxicológica relevantes, todavia nas pastagens demasiados factores se encontram em concorrência, pelo que a tentativa de aplicar uma mensuração científica é um desafio verdadeiramente árduo.

Relativamente aos alimentos compostos para animais e respectivas matérias-primas, existem em Portugal limites máximos deliberados para aflatoxinas e ocratoxina (Dec. Lei nº 100/2004, DR nº 104, I série de 4 de Maio e Regulamento 472/2002 EC de 12 de Março, respectivamente). Quanto à aflatoxina B1, o limite máximo definido para as matérias-primas (alimentação animal) é de 0,020 µg/kg e para alimentos completos é de 10 µg/kg, tendo em conta um teor de humidade de 12%. No que diz respeito à ocratoxina, o limite máximo admitido é de 5 µg/kg para cereais em grão e 3µg/kg para os derivados de cereais (consumo directo). Finalmente, os teores máximos admitidos de DON e Fumonisinas, situam-se em 1000 e 1000-3000 µg/kg, respectivamente ([FAO] citada por Guerra et al., 2005)

Em conclusão, uma última referência, desta vez a Hamilton (citado por Whitlow et al., 1998), por ter concluído que o melhor caminho para o estabelecimento de níveis de segurança relativos a micotoxinas seria através de uma convergência entre os estudos epidemiológicos e as investigações laboratoriais, acrescentando que seria impossível definir um nível de segurança sob condições laboratoriais que fosse exactamente transponível para as condições de campo.

5.3 – Medidas de controlo: prevenção das micotoxicoses na pastagem

Smith e Towers (2001) enfatizam três estratégias fundamentais para prevenir micotoxicoses: prevenir ou reduzir a ingestão de toxinas; proteger o animal contra as toxinas ingeridas e por último criar animais mais resistentes.

5.3.1 – Prevenir ou reduzir a ingestão de toxinas

5.3.1.1 – Evitar as pastagens tóxicas

Para a maioria dos fungos toxigénicos não existe correlação entre o número de esporos ou massa micelar e as concentrações de micotoxinas por eles produzidas, porém a observação rotineira das pastagens constitui um importante ponto de partida para a profilaxia. Há fungos parasitas que poderão ser observados por análise directa de sinais visuais característicos, como é o caso do *Claviceps spp.*, que infesta as hastes florais de gramíneas e forrageiras com os seus corpos escleróticos; outros, como os endófitas, desenvolvem-se em plantas específicas, que ao serem reconhecidas na pastagem poderão constituir amostras para análise laboratorial. A simplicidade e relativa rapidez de execução de um teste ELISA, tornam-no particularmente apropriado para avaliar amostras de pastagens ou de urina dos animais. Por outro lado há pastagens que poderão levantar suspeitas de contaminação micotoxicológica com base nos padrões climáticos e ocorrência sazonal.

Com base nestes dados surge a possibilidade de adopção de várias medidas de controlo, tais como a passagem dos efectivos para pastagens não suspeitas, tratamento das áreas contaminadas (ou que potencialmente possam vir a ser contaminadas) com fungicidas ou com uma garrafada de Zinco e finalmente o corte das espigas de culturas parasitadas. Também uma redução do encabeçamento poderá ser uma medida a adoptar visto que havendo maior disponibilidade de alimento, a selectividade dos animais aumenta. Durante os períodos em que os níveis de toxinas presentes nas pastagens sejam elevados e predominem as plantas contaminadas, é importante o fornecimento de forragens conservadas ou cortadas de boa qualidade para evitar que os animais sejam forçados a ingerirem até os alimentos mais desagradáveis (Smith and Towers, 2001)

5.3.1.2 – Redução da produção de toxinas

É possível condicionar a produção de micotoxinas se a germinação dos esporos fúngicos for inibida, isto é, utilizando de modo preventivo pulverizações com fungicidas, pois estes possibilitam diminuir não só o número de esporos no momento da pulverização como também o número de esporos ao longo das gerações subsequentes em cerca de 55 – 65%. Todavia no que diz respeito a fungos de armazenamento esta medida será somente eficiente se associada a boas práticas de armazenamento, com a vantagem adicional de proteger a salubridade das sementes armazenadas e consequentemente permitir o crescimento de sementeiras e pastagens livres de toxinas à partida. Os produtos fungicidas mais usados são os benzimidazóis, amónia,

ácido propiónico, ácido acético ou sais de ácidos orgânicos como por exemplo propionato de cálcio. (Smith and Towers, 2001).

5.3.1.3 – Modificação da população de fungos

Esta estratégia consiste na realização de um controlo biológico dos cultivares através da introdução, num determinado ecossistema, de numerosos fungos seleccionados geneticamente para não produzirem ou produzirem em quantidades diminutas as toxinas que afectam os animais mantidos em pastoreio, de forma a que estes se tornem na população fúngica dominante. Efectivamente trata-se duma abordagem promissora e com inúmeras vantagens, como é exemplo a aplicação de azevém e festuca infectados com *Neotyphdium* endófitas seleccionados, pois estas estirpes não produzem lolitrem B nem alcalóides ergopeptídicos, responsáveis pelos efeitos nefastos na saúde animal, mas continuam a gerar paramina, um composto insecticida que melhora a taxa de sobrevivência das plantas hospedeiras. Não obstante, desenvolver um inóculo que confira protecção efectiva, com um custo por hectare economicamente sustentável é a verdadeira problemática desta estratégia. Adicionalmente, os ensaios realizados sugerem que a taxa de persistência das estirpes não toxinogénicas nas pastagens é reduzida: quatro meses após a aplicação das estirpes inócuas somente 53% dos isolados eram não toxinogénicos (no momento pós-aplicação obtiveram-se 80 a 90% de isolados inócuos), e quinze meses depois apenas 4%. No entanto a sobrevivência a longo prazo destas estirpes poderá não representar uma limitação nos países que naturalmente possuam uma população elevada de estirpes não toxinogénicas nas suas pastagens. (Smith and Towers, 2001).

5.3.2 – Protecção dos animais contra as toxinas ingeridas

Esta estratégia reflecte a tentativa de imunizar os animais contra as micotoxinas, e neste sentido muitos ensaios experimentais têm sido levados a cabo, todavia grande parte deles sem resultados práticos de relevo. Apenas se encontra comprovado que a administração de sais de zinco em doses elevadas e na forma de óxido de zinco é efectiva na protecção dos animais contra a esporidesmina (eczema facial), podendo reduzir as lesões hepáticas e as quebras produtivas se fornecido na altura ou antes da exposição à toxina. (Smith and Towers, 2001).

5.3.3 – Obtenção de animais resistentes

A elevada variabilidade de respostas individuais perante a exposição às micotoxinas alvitra que alguns animais sejam mais resistentes e tolerantes que outros, o que leva a crer que talvez se possam obter animais mais resistentes à doença mediante o desenvolvimento de um programa de melhoramento animal (Smith and Towers, 2001).

No entanto a criação de equinos geneticamente modificados é uma opção com reduzida aplicabilidade, uma vez que os criadores preferem valorizar as características genéticas, fenotípicas e atléticas dos progenitores e a natural transmissão destas aos seus filhos.

PARTE III – Estudo de casos

1 – Metodologia

Nesta parte vamos explicitar o que motivou o presente estudo, enquadrar e justificar o problema, apresentar a amostra, referir as condições de realização do estudo, especificar os métodos e os procedimentos e elencar os materiais e os meios utilizados.

1.1 – Problema

Um assunto que parece ser de difícil decisão é perceber se perante determinados sintomas que poderiam indicar diferentes patologias, conseguimos encontrar o que realmente motiva o que está a acontecer, que, em certos casos, é de difícil resolução porque a sintomatologia pode sugerir indicações diversas que nos podem conduzir a despistar a doença inadequada com todas as consequências que podem daí resultar para os animais.

É certo que perante uma perturbação da coordenação motora, sobretudo durante o movimento, e que atinja equinos jovens que se encontram em livre pastoreio, a sintomatologia apresentada poderá estar associada a ataxia por *Paspalum*, mas também a outras quantas doenças.

Como este assunto tem uma particular relevância visto que os animais estavam a campo e foi observado *Paspalum dilatatum* Poir na pastagem, o que se pretende com este estudo é averiguar se o fungo *Claviceps paspali*, parasita da planta forrageira *paspalum* e produtor de micotoxinas tremorgénicas, está na origem do quadro neurológico apresentado pelos animais que constituem a presente amostra, isto é, se efectivamente estamos perante casos esporádicos de ataxia por *Paspalum*.

1.2 – Amostra

A amostra deste estudo é composta por sete animais que apresentavam sintomatologia nervosa, três fêmeas e quatro machos, todos eles poldros Puro Sangue Lusitano. As idades estão compreendidas entre os 5 meses e um ano de idade. Na realidade o surto apenas foi noticiado após a morte de dois animais, sendo então lançado o alerta, pois enquanto os cadáveres estavam a ser recolhidos da pastagem, foram observados comportamentos anómalos em cinco animais, os quais apresentavam exactamente os mesmos sintomas, realizaram exactamente os mesmos exames e receberam precisamente o mesmo tratamento, pelo que vou abordá-los e descrever a sua situação em conjunto.

Em Portugal as patologias dos poldros raramente são detectadas de forma precoce, pois estes permanecem na pastagem até ao fim da primeira primavera em que já possuem três anos, fazendo-se então o desbaste que dura dois a quatro meses até o animal se deixar manipular. Este sistema de produção de poldros em regime extensivo atravessa um momento crítico, que é a altura do desmame e se efectua tradicionalmente por volta do sexto mês de idade, podendo contudo ser antecipado para o quarto mês visto que nesta altura o leite materno deixa de constituir a principal fonte de nutrientes. Quando em pastagem, regra geral retiram-se gradualmente do grupo de éguas afilehadas as mães dos poldros mais velhos, pois os poldros sentem menos a falta das progenitoras com o apoio do “grupo”.

Figura 16: Imagem exemplificativa de um “eguada” em sistema extensivo (imagens Google)



1.3 – Enquadramento

Os casos abordados ocorreram na região das lezírias do Tejo, área esta que se caracteriza por terrenos ricos em húmus, concentrações salinas elevadas e periodicamente alagados por enchentes dada a proximidade da foz do rio Tejo. Os solos mantêm sempre uma humidade intrínseca, daí que na gíria os designem por “terrenos moles”.

As pastagens da lezíria são consideradas razoáveis em termos de qualidade, e o clima desta região é amenizado pela presença dominante do Tejo e dos ventos litorais, pelo que não se verificam amplitudes térmicas discerníveis. Dominam os planaltos, pois o terreno é muito pouco acidentado, o que contribui para a aptidão da região em termos de criação de cavalos, a qual remonta a 1896 e se tem expandido no âmbito produção de equinos de recria e desporto com especial destaque para o cavalo Lusitano (Madeira de Carvalho, 2001).

Figura 17: localização da lezíria do Tejo (www.cm-azambuja.pt e www.wikipedia.pt)



A amostra em estudo incluía-se numa “eguada” composta por éguas de ventre (cerca de 25) e poldros em fase de desmame (entre os 6 e 8 meses) e de recria (com 8 meses a 1 ano de idade), que se encontravam num parque de pastagem natural. Nessa pastagem foi detectado *Paspalum dilatatum* Poir em abundância parasitado pelo fungo *Claviceps paspali* (mais de 80%), cuja identificação era bastante simples dadas as características dos corpos escleróticos tóxicos pertencentes ao fungo, tal como ilustra a seguinte figura:

Figura 18: *P.dilatatum* infectado por *Claviceps paspali*. Notar a forma esférica e coloração acastanhada características do corpo esclerótico do referido fungo (Original).



O sistema produtivo da exploração tenta maximizar os recursos alimentares proporcionados pelas pastagens espontâneas na altura da Primavera e Outono, principalmente no período de Fevereiro/Março, altura em que se concentram os partos das éguas. Nos locais de estudo foram principalmente identificadas azevém espontâneo (*Lolium rigidum*), trevo branco (*Trifolium repens*) e morango (*Trifolium fragiferum*), cevada-dos-ratos (*Ordeum morinum*), junco (*Juncus bufonius*), saramago (*Raphanus raphanistrum*) e anafa (*Melilotus segetalis*) (Madeira de Carvalho, 2001).

O presente estudo iniciou-se no Mês de Outubro de 2009, quando surgiu o primeiro alerta: a morte de dois poldros no campo. Esta situação chamou a atenção dos proprietários, que observaram comportamentos anómalos em mais cinco jovens animais. Estes pareciam “embriagados”, denotando franca dificuldade na coordenação dos movimentos e tremores musculares. Por esta altura o clima mantinha-se ameno, as temperaturas situavam-se na ordem dos 25°C – 28°C e faziam-se sentir as primeiras brisas que assinalam o fim do Verão.

1.4 – Tipo de estudo

Trata-se de um estudo do tipo qualitativo (Bunge, 1985), por procurar dar conta da realidade, tal como a vivem os sujeitos do estudo. Ou seja, pretende-se entrar dentro da vida dos alvos do estudo para compreender o que realmente aconteceu e assim encontrar resposta aos problemas enunciados.

É um estudo que assume as características de “estudo caso”, por dizer respeito a um indivíduo, ou um grupo de indivíduos muito limitado.

1.5 – Material e métodos

Este estudo de caso é baseado em sete casos clínicos e realiza-se numa perspectiva qualitativa, abordando os seguintes parâmetros: história pregressa, onde serão expostos os dados identificativos do animal e as razões porque foi incluído neste estudo; Sinais clínicos, parâmetro este que constitui a descrição do quadro sintomatológico a partir do momento em que o animal se tornou um alvo de estudo; Exames complementares de diagnóstico, que compreende as análises laboratoriais efectuadas ao poldro e quais os resultados obtidos; e por último tratamentos e progressão da doença, que regista as terapêuticas instituídas durante o processo, assim como a evolução dos sintomas e do estado de saúde do animal.

Por outras palavras, para responder ao problema do presente estudo foram utilizados os seguintes meios: registo da sintomatologia apresentada por cada animal; Observação da pastagem *in loco*; Exames laboratoriais para despiste de outras doenças neurológicas, realizados pelo LNIV (Laboratório Nacional de Investigação Veterinária) e que incluíram a pesquisa por PCR, ELISA e Imunofluorescência indirecta do vírus da rinopneumonia equina (EHV 1 e 4) e vírus do Nilo Ocidental (WNV), pesquisa de aflatoxinas e pesquisa bacteriológica de anaeróbios; Exames anatomopatológicos e exames histopatológicos, ambos também executados pelo LNIV.

2 – Estudo de casos

2.1 – Caso Clínico I

2.1.1 – História pregressa

O primeiro caso clínico diz respeito a um equino de um ano de idade, fêmea e de raça Puro Sangue Lusitano. Encontrava-se no cercado onde foi identificado *Paspalum dilatatum* em abundância e em estado de floração (a identificação da planta ocorreu numa visita à herdade, posteriormente à morte da poldra). Nas espigas da referida planta foi possível detectar à vista desarmada pequenas esferas acastanhadas que correspondem aos corpos escleróticos do fungo parasita *Claviceps paspali*. A estadia do animal nesse cercado durava quase há um ano e em meados de Outubro de 2009 a poldra foi encontrada morta.

2.1.2 – Sinais clínicos

Não foram detectados sinais clínicos, pois os tratadores encontraram o animal já sem vida. Na verdade, em Portugal raramente as patologias em poldros são detectadas de forma precoce, o que se deve sobretudo ao sistema de manejo instituído.

2.1.3 - Exames complementares de diagnóstico

O cadáver deste animal foi enviado para os Serviços de Anatomia Patológica do LNIV, os quais procederam ao exame anatomopatológico, obtendo os seguintes resultados: No exame externo observaram várias escaras por todo o corpo (eventualmente algumas por decúbito). À abertura da cavidade oral notaram a presença de múltiplas formações nodulares, de dimensões variáveis e que faziam saliência na superfície da mucosa da faringe e, por pressão, deixavam sair uma substância de aspecto necropurulento de coloração branca. Estas formações existiam também, embora em menor grau, na mucosa de laringe. No exame da cavidade torácica registaram congestão pulmonar, em que o parênquima apresentava um certo grau de consolidação a nível dos lóbulos apicais. No exame da cavidade abdominal assinalaram congestão renal. À abertura da cabeça detectaram intensa congestão das coanas, porém o Sistema Nervoso Central não apresentava alterações macroscópicas a registar.

Os Serviços de Histopatologia recolheram amostras do sistema nervoso central e amígdalas, as quais após analisadas revelaram: Ao nível do SNC verificou-se edema do espaço perivascular de Virchow-Robin na maioria dos vasos sanguíneos do tecido nervoso; algum grau de espongiose da substância branca do cerebelo; edema ao nível da camada de células de Purkinje e ainda imagens de degenerescência e necrose de algumas células de Purkinje. Relativamente à amígdala, esta apresentou acumulação de células epiteliais descamadas, células inflamatórias e aglomerados bacterianos no interior das criptas e simultaneamente foi observada uma certa hiperactividade dos folículos linfóides.

Em síntese, os dados obtidos através da necropsia foram pouco específicos, pelo que se tentará interpretar a maioria dos achados patológicos com base nos estudos de Santos (1979). Para começar, este autor sugere que os nódulos na superfície da laringe podem indicar uma laringite catarral crónica, patologia relativamente comum no cavalo e caracterizada pelo espessamento da mucosa com proliferações polipóides. Quanto à congestão pulmonar, Santos (1979) afirma que é observada no início dos processos inflamatórios, quando se verifica redução da pressão atmosférica e quando são realizadas punções de exsudados pleurais. Relativamente às congestões assinaladas noutros órgãos (congestão renal e congestão das coanas) mais uma vez se refere que provavelmente estão associadas ao início de processos inflamatórios.

Acerca da histopatologia do sistema nervoso central há que esclarecer o facto de não existirem gânglios linfáticos quer ao nível do encéfalo quer ao nível da medula, pelo que os vasos do encéfalo são rodeados por um espaço designado Virchow-Robin ou espaço linfático perivascular, o qual é responsável pela drenagem da linfa. Quando surge edema ao nível do encéfalo, este tende a localizar-se especialmente nos espaços de Virchow-Robin, os quais surgem muito dilatados até que o processo se estenda para a própria massa nervosa. Estes edemas podem possuir um carácter agónico ou decorrerem de processos inflamatórios, desmielinizantes, hiperemias activas e passivas. A degenerescência e necrose das células de Purkinje estão principalmente associadas a infecções víricas com tropismo evidente para o tecido nervoso, determinadas intoxicações por plantas com princípios neurotóxicos e exposição excessiva a certos agentes físicos, como os raios X (Santos, 1979).

Ou seja, perante um surto duma doença neurológica ainda não confirmada, seria de esperar que os animais mortos apresentassem significativas lesões nervosas, uma vez que a maioria das doenças neurológicas reflecte-se em lesões macroscópicas importantes, o que não se

verificou, coincidindo com a opinião de vários autores (Scarratt, 2004; Higgings, 1995) no que respeita à inexistência de sequelas nos casos de ataxia por *Paspalum*.

Entretanto o Departamento de Virologia pesquisou através de PCR a presença do vírus da Rinopneumonia dos equinos (EHV 1 e 4), cujo resultado foi negativo; e também a presença do vírus do Nilo Ocidental (WNV), igualmente negativa.

Os Serviços de Micologia encarregaram-se pela pesquisa de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, sendo que todas elas se consideraram não detectadas uma vez que os valores obtidos foram abaixo do limite de detecção (0,18 µg/kg).

2.2 – Caso clínico II

2.2.1 – História pregressa

O segundo caso clínico está relacionado com um macho, de sete meses de idade e raça Puro Sangue Lusitano. Encontrava-se na mesma “eguada” que o animal anterior, a qual pastava no terreno invadido por *Paspalum dilatatum* contaminado. O poldro nasceu em Abril de 2009 e permaneceu neste cercado até meados de Outubro de 2009, altura em que foi encontrado morto.

2.2.2 – Sinais clínicos

Antes de ser encontrado morto na pastagem, este poldro revelava alguma incoordenação de movimentos, porém quando parado nada de anómalo se detectava.

2.2.3 – Exames complementares de diagnóstico

O cadáver do poldro foi recebido nos Serviços de Anatomia Patológica do LNIV que procederam ao exame anatomopatológico, obtendo os seguintes resultados: No exame externo verificaram-se hemorragias musculares focais nos membros anteriores; À abertura da

cavidade oral observaram-se múltiplas formações nodulares na região da faringe e laringe, assim como congestão da traqueia; No exame da cavidade torácica observou-se congestão pulmonar com densificação do parênquima nos lóbulos apicais; Por último o exame da cavidade abdominal registou a presença de grande quantidade de alimento no estômago, presença de formas parasitárias aderentes à mucosa do mesmo e cujo aspecto macroscópico permitiu suspeitar de *Gastrophilus*, balonização intestinal e ainda amolecimento da polpa renal.

Os Serviços de Histopatologia colheram amostras de pulmão, SNC e amígdala para análise, observando congestão pulmonar generalizada com edema alveolar; edema ao nível dos espaços perivasculares de Virchow-Robin ao nível do SNC; e preenchimento das criptas das amígdalas por células epiteliais descamadas, células inflamatórias e detritos celulares simultaneamente com presença de aglomerados bacterianos.

Como se verifica, os achados anatomo-patológicos pouco diferem dos observados no primeiro caso clínico e novamente se reitera a ideia da insignificância das lesões nervosas.

O Departamento de Virologia procedeu ao despiste de EHV 1, 4 e WNV, pelo que o resultado obtido por PCR foi negativo.

O exame micológico para pesquisa de aflatoxinas também se realizou e os resultados para AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 foram todos inferiores ao limite de detecção.

Para despiste de uma possível infecção bacteriana, Os Serviços de Diagnóstico Bacteriológico realizaram culturas das vísceras, laringe e sangue, registando os seguintes resultados: isolou-se *Clostridium sordellii* e *Rhodococcus equi* nas vísceras, *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus equi zooepidermicus* e *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* na laringe, e finalmente *Aeromonas hydrophila* na hemocultura. Na tabela 5 apresenta-se a flora bacteriana considerada natural nos vários tecidos do cavalo, assim como se referem os tecidos estéreis, onde não é normal encontrar estes microorganismos.

Tabela 5: tecidos onde existe uma flora bacteriana natural, quais as bactérias que geralmente integram tal flora natural e tecidos considerados estéreis, onde não é espectável encontrar agentes bacterianos (Hodgson, Hughes and Hodgson, 2008).

Tecidos com flora bacteriana	Flora bacteriana	Tecidos sem flora bacteriana
Derme	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus spp.</i> <i>Micrococcus spp.</i> <i>Corynebacterium spp.</i>	Endoderme Tecido subcutâneo Músculo
Cavidade oral Trato Gastro -Intestinal	Enterobacteriáceas (<i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i>) <i>Actinobacillus spp.</i> Anaeróbios incluindo <i>Actinomyces spp.</i> <i>Bacteroides spp</i> <i>Fusobacterium spp.</i> <i>Clostridium spp</i> *	Cavidade peritoneal Fígado, rins e baço
Cavidade nasal (até à laringe)	<i>S. equi zoopidemicus</i> * <i>Streptococcus spp.</i> <i>Pasteurella spp.</i> <i>Actinobacillus spp</i> <i>Actinomyces spp</i>	Traqueia Pulmões Cavidade pleural
Uretra distal	<i>Streptococcus spp.</i> Enterobacteriáceas Anaeróbios incluindo <i>Bacteroides spp.</i>	Uretra proximal Bexiga
Vagina Porção externa do cérvix	<i>Streptococcus spp.</i> Enterobacteriáceas Anaeróbios incluindo <i>Bacteroides spp.</i>	Útero
*Bactérias encontradas nas culturas referentes ao caso II		Sangue
		Osso, articulações, tendões e ligamentos
		Líquido cefalorraquidiano

2.3 – Casos clínicos III, IV, V, VI e VII

2.2.4 – História pregressa

Estes quatro casos serão reportados em conjunto uma vez que todos os animais partilhavam o mesmo ambiente, apresentavam os mesmos sinais, realizaram os mesmos exames complementares de diagnóstico, receberam o mesmo tratamento e evoluíram da mesma forma.

O animal III tratava-se de uma poldra e o animal IV um poldro, com idades compreendidas entre os seis e sete meses de idade. O animal V era uma poldra de um ano de idade, o animal VI um macho de sete meses e o animal VII também um macho, de cinco meses de idade. Estes animais encontravam-se no mesmo cercado e integravam a mesma “eguada” dos animais mortos, pelo que os sinais clínicos que apresentavam somente foram notados após a morte dos dois primeiros jovens. A partir desse momento os poldros em questão foram transferidos para boxes individuais e isolados dos restantes equinos da herdade.

2.2.5 – Sinais clínicos

A observação dos poldros realizou-se em duas etapas: primeiramente avaliou-se o comportamento dos animais dentro das boxes em descanso e seguidamente retiraram-se para o exterior de forma a observá-los em andamento. Em descanso, os animais revelavam ligeiros tremores, mas aparentemente nada de significativo. Assim que os tratadores entraram nas boxes, os jovens cavalos demonstraram hiperexcitabilidade, e após algum esforço foi possível trazê-los para o exterior. O terreno era plano e de terra batida, todavia os animais manifestaram evidente descoordenação. Por momentos permaneciam em ataxia estática e quando incitados a deslocarem-se revelavam uma marcha rígida, com os membros afastados na tentativa de melhorarem o equilíbrio. A situação mais problemática assinalou-se na inversão do sentido de marcha, pois era notória a dificuldade dos poldros em rodarem sobre si mesmos, pelo que necessitavam descrever largas meias luas para realizarem a rotação. Em conclusão, o quadro clínico revelado por estes animais registava ataxia quer estática quer locomotora, hipermetria, hiperexcitabilidade, marcha rígida e fasciculações.

2.2.6 – Exames complementares de diagnóstico

A todos os poldros foi retirado sangue para despistagem de EHV 1, 4 e WNV por PCR, ELISA e Imunofluorescência indirecta, excepto no caso da poldra V, à qual foi recolhido líquido cefalorraquidiano para despiste dos mesmos vírus, mas desta vez recorrendo apenas à técnica de PCR. Todos os resultados recebidos foram negativos.

2.2.7 – Tratamento e progressão da doença

A primeira medida tomada foi retirar os cinco animais da pastagem contaminada para um local tranquilo, mantendo-os separados em boxes individuais. Forneceu-se forragem de qualidade, cenouras pelo facto de serem muito apreciadas pelos equinos e água *ad libitum*. O tratamento instituído foi meramente paliativo: foi-lhes veiculada vitamina C na água da bebida (*Zoosol AD3EC® 20ml*) devido à função anti-oxidante deste composto. Segundo Lewis (1995) os cavalos não necessitam de uma dieta suplementada com vitamina C, todavia a concentração plasmática de ácido ascórbico encontra-se diminuída em condições de stress e em várias doenças infecciosas, como é o caso da rinopneumonia equina, uma das doenças suspeitas neste estudo.

Apesar de se desconhecer há quanto tempo os animais se encontravam expostos ao agente agressor e a partir de que momento surgiram as primeiras manifestações clínicas da doença, a recuperação foi espontânea e passados cerca de cinco dias desde a saída do cercado com *Paspalum* os animais denotavam melhoras efectivas e uma postura equilibrada.

Figura 19: Ataxia locomotora num equino: Os membros torácicos estão afastados numa tentativa de manter o equilíbrio e os membros pélvicos cruzam-se de forma incoordenada (www.google.pt).



3 – Discussão dos resultados

Finda a recolha de dados e análises é possível comprovar que estes são coincidentes e complementares, corroborando a informação recolhida na literatura acerca da ataxia do *Paspalum*. De acordo com Moore et al. (2006) o primeiro passo do processo de diagnóstico é reconhecer o *Paspalum spp.* nas pastagens e avaliar se se encontra infectado pelos corpos escleróticos do *Claviceps paspali*. Estes são estruturas acastanhadas e redondas que substituem as sementes da planta em floração e contêm as micotoxinas tremorgénicas responsáveis pela sintomatologia nervosa manifestada pelos animais intoxicados: paspalitrems e paspalina. Com efeito, o risco de intoxicação aumenta se a planta constituir uma das espécies vegetais dominantes na pastagem em questão e se estiver em floração, o que ocorre no final do Verão, início do Outono. O caso assistido decorreu precisamente nesta altura do ano e ficou comprovado numa visita ao cercado, a grande disseminação de *P.dilatatum* por toda a pastagem, infestado pelo referido fungo tal como testemunham a figura 15 e a figura 18 (fotografias tiradas *in loco* durante o mês de Outubro). Lewis (1995) reitera a particularidade do *Claviceps paspali* se desenvolver apenas durante a floração e maturação da semente, não na planta madura, ou seja raramente durante o armazenamento. Uma curiosidade suscitada por este estudo foi porque razão somente poldros foram afectados, visto que as éguas também estavam expostas ao mesmo agente e à mesma dose de exposição. Na literatura afirma-se que as plantas quando contaminadas por fungos produtores de micotoxinas adquirem um sabor verdadeiramente desagradável. Talvez devido ao carácter curioso intrínseco dos poldros (Morris, 1999) juntamente com o facto dos animais integrantes da amostra se encontrarem na idade de início do pastoreio, inocentemente estes tenham sido motivados a ingerirem aquela planta tão abundante e acessível. Huntington et al (2004) defendem uma ideia igualmente coerente ao afirmarem que os cavalos têm tendência para “tomar o gosto” ao *Paspalum* infectado. Zanine et al. (2006) e Galvão (2009) sumarizam estas ideias afirmando que o comportamento de consumo dos animais é influenciado pela estrutura da pastagem e pela heterogeneidade da distribuição espacial da vegetação, ou seja, a disponibilidade de pastagem afecta o consumo total de alimentos pelos animais através de mudanças no comportamento de pastoreio.

Efectivamente todos os herbívoros possuem um comportamento de pastoreio característico, o qual varia consoante factores extrínsecos e intrínsecos. Os factores extrínsecos compreendem a disponibilidade de pastagem e o valor nutritivo da mesma, que por sua vez são influenciados pela carga animal existente. Os factores intrínsecos dizem respeito à espécie, idade, estado fisiológico do animal (crescimento, manutenção, gestação e lactação) e ao estado da dentição

(Galvão, 2009). Ainda existem os factores abióticos, que incluem temperatura, humidade, intensidade da radiação solar, entre outros. De acordo com Provenza (1996) os animais deixam de consumir determinado alimento através da aversão (acto involuntário) e sinais de feedback (efeitos nutricionais ou toxicológicos), únicos para cada alimento. As aversões podem ser pronunciadas quando os alimentos apresentam excesso de toxinas ou são deficientes em nutrientes específicos. Porém existem escassos estudos relativamente às variações no comportamento de pastoreio consoante a idade dos animais. Visto que sobre a espécie equina não se encontraram registos, procurar-se-á fazer um paralelismo com a espécie bovina. Costa et al. (2004) realizaram um estudo que objectivou analisar a composição química duma leguminosa infestante da pastagem (*Mimosa weddelliana*), produtora de alcalóides, e durante uma das observações no campo, aperceberam-se que enquanto as vacas ruminavam, vários bezerros com cerca de um mês de idade consumiam essas plantas, muito abundantes na pastagem. Mais tarde concluíram que a planta apresentava um valor nutritivo elevado. Na realidade, as causas que levam os animais jovens a ingerirem plantas tóxicas ainda não estão perfeitamente esclarecidas, ao passo que nos animais adultos esse facto está normalmente relacionado com escassez de alimento e fome.

Não obstante a presença de *Paspalum* colonizado por *Claviceps paspali* na pastagem não é argumento absoluto para afirmar que nos deparamos com casos de ataxia do *Paspalum*. Esta evidência necessita ser confirmada pelos achados clínicos e eliminação de outras possíveis causas de afectação do sistema nervoso (Reed and Bayley, 1998). O quadro clínico traçado para estes animais é concordante com a sintomatologia de ataxia do *Paspalum* revista na literatura. Tal como afirmam Hopkins et al (2005) esta doença é progressiva, daí que a manifestação inicial dos sintomas seja ligeira, tornando-se porém exacerbada se os animais forem estimulados e agitados. Talvez por esta razão tenha passado despercebido o início da manifestação da doença e somente se tenham tomado medidas após a morte dos dois primeiros casos. É difícil precisar se o animal I e II estariam ou não em estado mais avançado da doença, pois como já foi referido, o típico sistema de manejo instituído devota os poldros a um certo “abandono”. Todavia na literatura é várias vezes repetido que a ataxia do *Paspalum* não é fatal, pelo que as mortes relatadas são geralmente causadas por acidentes ou incapacidade dos animais afectados obterem água (Valencic, 1995). Do mesmo modo, a partir do momento em que os animais são retirados da pastagem contaminada, as melhorias do estado de saúde são efectivas não havendo sequelas, ou seja, a recuperação é total, tal como se verificou no presente estudo. Presumivelmente a reversibilidade natural das lesões está relacionada com o rápido metabolismo e excreção destas micotoxinas (Bryden, 1989).

De um modo geral, os sinais da ataxia do Paspalum reflectem um envolvimento vestibulocerebelar ligeiro a moderado, que varia desde (1) uma marcha instável, fasciculações e excitabilidade, evoluindo para (2) hipermetria, ataxia, marcha rígida até (3) espasmos musculares, prostração e convulsões tetânicas, podendo culminar em parálisia total (Lewis, 1995). Poder-se-á declarar que os poldros do presente estudo correspondiam a um quadro sintomatológico intermédio (2).

Relativamente ao caso I e II, sendo estes os animais que dispararam o alerta da doença, foram alvo de maior número de exames complementares de diagnóstico. Realizaram-se as necrópsias e foram requeridos exames para despiste de algumas afecções nervosas mais comuns visto que os restantes doentes apresentavam um quadro neurológico similar, o que levava a crer que os poldros I e II tivessem sucumbido devido a uma patologia do Sistema Nervoso Central. Sendo assim, mantendo-se como primeira suspeita a ataxia do Paspalum, em segundo lugar suspeitou-se duma infecção viral por rinopneumonia dos equinos (EHV 1 e 4) ou vírus do Nilo Ocidental (WNV). A rinopneumonia dos equinos produz três síndromes diferentes, pelo que a forma neurológica da doença (encefalomielite), é muito contagiosa e fatal, manifestando-se por ataxia (principalmente nos posteriores), paralisia, dificuldade em levantar-se e manter-se de pé e incapacidade em urinar/defecar, evoluindo de forma fulminante (Allen, 2002). Em linhas gerais poder-se-ia enquadrar na situação em estudo, pelo que todos os animais foram submetidos a exames serológicos de rastreio, obtendo-se sempre resultados negativos pelo que esta suspeita foi despistada. Simultaneamente o mesmo rastreio foi realizado para o WNV, o qual origina meningo-encefalites em equinos, representadas por um quadro febril agudo com ataxia, hiperexcitabilidade, andar em círculos, bruxismo, anorexia e depressão. Transmite-se entre os hospedeiros vertebrados por intermédio de artrópodes vectores competentes e apesar da mortalidade elevada, os sobreviventes recuperam em 2 a 3 semanas após o início dos sinais (Flores e Weiblen, 2008). Pelo facto dos equinos serem bastante sensíveis e devido à presença enzoótica do vírus em quase todos os países da bacia do mediterrâneo (Formosinho et al., 2006) efectuou-se o rastreio e todos os resultados foram negativos.

Em terceiro lugar desconfiou-se duma possível aflatoxicose na medida em que esta doença também é caracterizada por ataxia e convulsões, apesar de não se terem verificado mucosas ictéricas, anorexia, nem cólica, sintomas igualmente muito típicos. Para confirmação realizou-se a análise micológica e descartou-se esta hipótese uma vez que os resultados foram negativos no caso I e II.

Por último, averiguou-se a possibilidade de infecção bacteriana através de culturas das vísceras, laringe e sangue. Não se efectuou uma cultura do líquido cefalorraquidiano, pois tal como sugerem Hodgson et al. (2008) frequentemente não é possível tirar conclusões específicas. Em todo o caso os autores aludem que perante uma suspeita de meningite bacteriana é aconselhável a realização de uma citologia do líquido cefalorraquidiano com o objectivo de encontrar evidências de um processo inflamatório em curso. As meningoencefalites bacterianas resultam usualmente da disseminação via hematogénica de bactérias patogénicas Gram negativas, predominantemente *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.* e *Salmonella spp.*, apesar de infecções com *Staphylococcus spp.*, *Actinobacillus equi* e *Pasteurella spp.*, ou infecções mistas, também poderem ocorrer (Murphy, 1995). Algumas bactérias foram isoladas dos tecidos do poldro II, das quais duas constam na lista da flora bacteriana natural mais frequente: *Streptococcus equi zooepidermicus* na laringe e *Clostridium sordeli* nas vísceras.

Relativamente a *Rhodococcus equi*, trata-se duma bactéria aeróbia estrita encontrada normalmente no trato gastro-intestinal de equinos visto que, sendo um organismo telúrico, os animais ingerem-no facilmente durante o pastoreio. A sua multiplicação ocorre com alguma frequência no intestino delgado de poldros até aos seis meses, conduzindo a broncopneumonias, enterites e linfadenites. Esta susceptibilidade dos poldros permanece incógnita, todavia suspeita-se que esteja relacionada com o facto do período entre o primeiro e o sexto mês de vida coincidir com o declínio dos anticorpos maternos adquiridos via colostro e o sistema imune se encontrar ainda imaturo, sobretudo ao nível da resposta celular. Nos adultos a infecção é deveras rara e quando se desenvolve é decorrente de estados imunodepressivos. Na realidade *R. equi* é responsável por 3% das mortes de poldros em todo o mundo, sendo que a bacterémia iniciada nos pulmões pode generalizar-se via hematogénica e originar meningite e abscessos cerebrais (Krewer et al., 2008). Estes dados levam-nos a pensar que uma infecção com *R. equi* poderia eventualmente estar na origem das mortes dos dois animais deste estudo e ser responsável pelo quadro neurológico manifestado pelos restantes animais, contudo numa infecção com *R. equi* há evidências de envolvimento do aparelho respiratório, como sejam tosse e taquipneia, as quais não foram observadas, para além de que os animais falecem por insuficiência respiratória decorrente de necrose do parênquima pulmonar (Krewer et al., 2008), situação esta que não é confirmada nos relatórios das necrópsias, pelo que a hipótese foi descartada.

Quanto ao *Staphylococcus intermedius*, não consideramos que o seu isolamento esteja relacionado com a patologia apresentada pelos animais em estudo, na medida em que esta

bactéria foi isolada por Hajek em 1976 nas vias aéreas superiores de equinos, segundo relatam Santos et al. (2008). Estes autores também esclarecem que a bactéria é responsável pelo desenvolvimento duma foliculite quando a barreira protectora natural da pele está comprometida.

No que diz respeito à *Klebsiella pneumoniae pneumoniae*, também não nos parece possuir qualquer relevância para a presente situação, visto tratar-se duma enterobactéria cujo reservatório natural é o intestino de animais e humanos e cujos efeitos patogénicos mais comuns são endometrites e consequentemente abortos de origem infecciosa (Lemos et al., 2007).

Acerca do isolamento de *Aeromonas hydrophyla* na hemocultura, constituiu um resultado surpreendente e sem explicação aparente. Staples (2000) assume que muitos dos isolados são obtidos de um crescimento bacteriano múltiplo e constituem provavelmente contaminantes. De qualquer modo, as patologias provocadas por esta bactéria, que habita ambientes aquáticos, não se enquadram nos casos clínicos da actual dissertação: problemas reprodutivos em éguas, diarreia e artrite séptica em poldros. Além do mais, Staples (2000) afirma ainda que raramente ocasiona patologias significativas nos animais de pastoreio e certos casos reportados são incertos e duvidosos, portanto será mais uma suspeita descartada.

Terminadas as avaliações dos exames complementares de diagnóstico, concluímos que nenhuma infecção, vírica ou bacteriana, esteve na origem do quadro neurológico apresentado pelos animais. As informações relativas à necrópsia e à histopatologia não foram conclusivas, o que está de acordo com a literatura no que diz respeito à intoxicação por paspalum. Higgings (1995) refere que alterações neuropatológicas definitivas não são observadas nas necrópsias, e Scarratt (2004) remata comunicando que a examinação microscópica do sistema nervoso central não é notável. No entanto alguns aspectos descobertos nas necrópsias dos dois animais coincidiram e talvez possam estar associados à ataxia por paspalum. As escaras e hemorragias nos membros possivelmente relacionam-se com eventuais quedas e acidentes que os poldros tenham sofrido, pois a descoordenação sentida pelos animais afectados pode ser grave o suficiente para que tropecem e caiam desamparados enquanto tentam deslocar-se, e assim voltem a cair enquanto debatem para se erguerem (Hopkins et al., 2005). Os nódulos disseminados ao longo da faringe e laringe, assim como a congestão da árvore respiratória, situações comuns em ambos os animais, aparentemente não possuem uma explicação óbvia a não ser que se estivesse a instalar um processo inflamatório por algum motivo. A congestão observada noutros órgãos (rins, traqueia e coanas) e a presença de células inflamatórias nas

criptas das amígdalas, também poderiam ser justificadas como resultantes do início de um processo inflamatório (Santos, 1975). Outro dado curioso foi o facto de ao nível do sistema nervoso central ambos revelarem edema do espaço perivascular de Virchow-Robin, pelo que levar a cabo uma investigação detalhada no sentido de confirmar em que medida a ataxia por *Paspalum* origina lesões e em que medida estas são verdadeiramente reversíveis seria um debate de cariz científico deveras interessante.

Em termos de tratamento, foi assumido o que se aconselha na literatura, ou seja, retiramos os animais da pastagem contaminada de modo a pôr um fim à exposição ao agente patogénico, fornecemos forragem nutritiva e asseguramos que permaneciam num local tranquilo e seguro, para além da terapia paliativa com vitamina C. Perusia e Rodríguez (2001) apoiam esta ideia afirmando que “somente a retirada dos animais do pasto contaminado conduz à recuperação em poucos dias” (pp.103, tradução livre). O Manual Merck de Veterinária (2007) sublinha que a recuperação se produz após o fim da ingestão de *Paspalum* infectado pelos corpos escleróticos do *Claviceps paspali* e que os animais se vêem menos afectados quando ficam sozinhos e lhes é fornecida boa forragem e alimentos apetecíveis, por essa razão também disponibilizamos cenouras aos poldros do nosso estudo. Relativamente à administração de vitamina C nada foi encontrado em referências bibliográficas que apoiasse esse procedimento. Alguns autores (Perusia e Rodríguez, 2001) sugerem a administração de promacina ou um derivado nos casos mais graves de modo a tranquilizar o animal e evitar que se lesione, apesar de Higgings (1995), Sinha e Cox (1995) preferirem diazepam ou fenobarbital no caso de apreensões frequentes. Outros apostam na administração de DMSO (Sinha and Cox, 1995) por desconfiarem que a ataxia do *Paspalum* produza algum grau de edema cerebral, situação que se verificou nos dois animais necropsiados e que apresentavam edema do espaço perivascular de Virchow-Robin. Efectivamente DMSO tornou-se a droga de eleição para gerir o edema cerebral em equinos visto que também tem uma acção antibacteriana, anti-inflamatória e promotora do fluxo sanguíneo nas áreas isquémicas através da inibição da agregação plaquetária. (Sinha and Cox, 1995)

4 – Avaliação final

Em suma, cumprimos todos os passos requeridos para o processo de diagnóstico da ataxia do *Paspalum* e estamos em posição de responder à questão problema do nosso estudo. Investigamos a história pregressa dos animais, avaliamos os sinais clínicos, detectámos *Paspalum* infestado pelos corpos escleróticos do *Claviceps paspali* em abundante quantidade ao longo de toda a pastagem (mais de 80%), despistamos outras doenças que originassem ataxia e comprometimento do sistema nervoso central, e observamos a rápida recuperação dos animais assim que foram afastados do pasto problema, pelo que assumimos estar efectivamente perante um surto de ataxia do *Paspalum*. Poder-se-ia ter recolhido amostras da pastagem para detecção de paspalitrems e paspalina, todavia seria um processo demorado e não propriamente essencial, uma vez que já havíamos reunido as evidências suficientes para confirmar a nossa hipótese.

5 – Recomendações

Os equinos que constituem doentes neurológicos necessitam acima de tudo cuidados paliativos e alguma paciência e preocupação por parte dos tratadores. É importante o fornecimento de alimentos nutritivos e apelativos, assim como a permanência num local sossegado. Uma vez que os animais se tornam beligerantes há que evitar manipulá-los em demasia e fazer uma aproximação cautelosa, não esquecendo a importância de tomar medidas adequadas que salvaguardem a sua segurança e impeçam que se auto-mutilem ou permaneçam em decúbito prolongado.

Simultaneamente, uma boa gestão da pastagem é uma medida fundamental para precaver situações deste género. É importante estar alerta para o aparecimento destas infestantes e, no caso do *Paspalum*, como a planta somente representa perigo nos meses de Setembro/Outubro, fazer um desbaste superficial da pastagem de maneira a eliminar as espigas corrompidas ou definir um pastoreio intermitente nos cercados contaminados são possíveis soluções (Scarratt, 2004).

6 – Conclusões

As micotoxinas estiveram implicadas em episódios de doenças ao longo de toda a história e um pouco por todo o mundo. Os princípios que caracterizam uma micotoxicose são o facto do seu agente causal provavelmente não ser identificado no imediato; não serem contagiosas de animal para animal; O tratamento com fármacos ter escasso efeito no curso da doença; os surtos serem geralmente estacionários devido a variações climáticas; existir uma associação específica com a ingestão de um alimento em concreto e por último o facto da presença de fungos micotoxigénicos no exame micológico não significar que ocorreu produção de micotoxinas (Manual Merck de Veterinária, 2007).

Verificámos que diversificados fungos micotoxigénicos se podem desenvolver no pasto e que muitos autores se dedicam a investigá-los e a desenvolver estudos epidemiológicos de prevalência e incidência. Porém no caso do *Claviceps paspali* os registos são escassos ou inexistentes, pelo que durante a elaboração da presente dissertação deparámo-nos com limitações em termos fontes literárias específicas, daí que tenhamos recorrido insistentemente a pesquisas na internet, e com limitações em termos do número de casos clínicos assistidos, pois ao longo de todo o estágio não se verificaram mais situações de ataxia do *Paspalum* a não ser a intoxicação dos sete poldros que constituíram a amostra deste estudo. Apesar do carácter esporádico desta patologia e do número de animais afectados ser diminuto, a ataxia do *Paspalum* é um problema real que se repercute na saúde e bem estar animal, e que pode ser facilmente evitado ou resolvido no caso de criadores e Veterinários estarem devidamente informados, razão esta que justifica a escolha deste tema para a presente dissertação.

Com a realização deste trabalho, apercebemo-nos da importância de alertar os criadores de cavalos para dois assuntos fundamentais: compreender que durante o primeiro ano de vida o poldro torna-se um ser social, que arrisca novas experiências e se deixa levar pela curiosidade, pelo que deveria haver uma vigilância rotineira que possibilitasse detectar qualquer problema o mais precocemente possível; e uma vez que o crescimento em sistema extensivo é sempre preferível tanto pela actividade que proporciona, como pelas taxas de crescimento mais balanceadas, uma gestão e monitorização da pastagem revela-se uma medida valiosa no que respeita à prevenção de intoxicações com micotoxinas das pastagens.

Bibliografia

- Agaié, B.M., Salisu, A. and Ebbo, A. (2007). A survey of common toxic plants of livestock in Sokoto State, Nigeria. *Scientific research and Essay*, 2 (2): 40 – 42.
- Alderman, S., Frederickson, D., Milbrath, G., Montes, N., Narro-Sanchez, J. and Odvody, G. (1999). A laboratory guide to identification of *Claviceps purpurea* and *Claviceps Africana* in grass and sorghum seed samples. *Oregon Department of Agriculture*, acedido em Abril, 17, 2010, disponível em <http://www.oda.state.or.us>
- Allen, G. P. (2002). Epidemic disease caused by equine herpesvirus-1: recommendations for prevention and control. *Equine Veterinary Education*, 14 (3): 136 – 142.
- Asquith, R. L. (1991). Mycotoxicoses in horse. In J. E. Smith & R. Henderson (Eds), *Mycotoxins and animal foods*. (pp. 679 – 687), Boca Raton: CRC Press, Inc.
- Barceloux, D. G. (2008). Mycotoxins. In *Medical Toxicology of Natural Substances*. (pp. 317–324). New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Barnett, D. T., Mowrey, R. A., Hagler, W. M. Jr., Bristol, D. G. and Mansmann, R. A. (1997). The correlation of selected mycotoxins to the incidence of colic in horses. *World Equine Veterinary Review* 3 (1).
- Bennet, J.W. and Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology, 16 (3): 497 – 516.
- Bernardo, F. and Martins, H.M. (2010). Micotoxinas em alimentos para animais, acedido em Maio, 10, 2010, disponível em <http://www.graq.isep.ipp.pt/uploadFiles/file/7WMT-BernardoMicotoxinasISEP2010.pdf>
- Blandino, M. Rayneri, A., Vanara, F., Tamietti, G. and Pietri, A. (2009). Influences of agricultural practices on *Fusarium* infection, fumonisin and deoxynivalenol contamination of maize kernels. *World Mycotoxin Journal*, 2 (4): 409 – 418.
- Bogo, A. and Boff, P. (1997). Occurrence of honey dew (*Claviceps africana*) on sorghum in Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 22:450
- Bryden, W. L. (1989). Fungal Neurotoxins. *Proc. Nutr. Soc. Aust.* (14) (pp. 45 – 53), disponível em <http://apjcn.nhri.org.tw/server/APJCN/ProcNutSoc/1980-1989/1989/1989%20p045-053.pdf>
- Bunge, M. (1985). *La Investigación Científica*. Ariel Methodos, Barcelona
- Carter G. R. and Wise, D. J. (2004). Introduction to the fungi and fungal Infections. In *Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology*. (6th edition). (pp. 245 – 248). Iowa: Iowa State Press.
- Carrillo, L. (2003). Los Hongos de los alimentos y forrajes – Capitulo 6: Micotoxinas, acedido em Maio, 14, 2010, disponível em <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micragri/micagricap6.pdf>
- Cartaz apresentado in Biovet Symposium. (2007). Interpretation of the results of mycotoxin's analysis in feed. Acedido em Março 10, 2010, disponível em http://en.engormix.com/MA-mycotoxins/generalities/articles/interpretation-results-mycotoxins-analysis_861.htm.

Casa, A. M., Mitchell, S.E., Lopes, C. R. and Valls, J. F. M. (2002). RAPD analysis reveals genetic variability among sexual and apomitic *Paspalum dilatatum* poiret biotypes. *The Journal of Heredity*, 93 (4): 300-302.

Castillo, J. M. S. (2007). *Micotoxinas en alimentos*. Espanha: Ediciones Díaz de Santos

Costa, A. C. O., Santos, S. A., Machado, R. A., Silva, S., Leitão, G. G., Melo, J. C. P., Petzold, H. V. (2004). Composição química e toxidez de *Mimosa weddelliana* em bezerros. *IV Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal*. Corumbá.

Costa, D. I., Scheffer-Basso, S. M., Favero, D. and Fontaneli, R. S. (2003). Caracterização morfofisiológica e agrônoma de *Paspalum dilatatum* Poir. Biotipo *Virasoro* e *Festuca arundinacea* Schreb. Disponibilidade de forragem e valor nutritivo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 32 (5): 1061-1067.

Delgadillo, I. & Nunes, A. (1997). Micotoxinas. In *Terra Fértil, Revista da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Viseu*, 3: 46 – 49.

Diaz, D. E., Blackwelder, W. M., Hagler, W. M., Hopkins, B. A., Jones, F. T., Anderson, K. L. and Whitlow, L. W. (1997). The potencial of dietary clay products to reduce aflatoxina transmission to milk of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 80 (suppl 1): 261.

Diekman, M. A. and Green, M. L. (1992). Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *Journal Animal Science*, (vol.70): 1615 – 1627.

D'Mello, J. P. F. B. (1998). Boletim científico nº 47. Acedido em Março, 25, 2010, disponível em <http://www.micotoxinas.com.br/>

Famosinho, P., Santos-Silva, M. M., Santos, A., Melo, P., Encarnação, V., Santos, N., Nunes, T., Agrícola, R. e Portas, M. (2006). O vírus West Nile em Portugal: estudos de vigilância epidemiológica. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 101 (557 – 558): 61-68.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2004). *Food and Nutrition Paper nº81*. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Rome. Italy, pp. 165 – 169.

Fernandes, R. R. G. (2007). *Micotoxinas: a situação actual da legislação e metodologias analíticas*. Disertação de Mestrado em Química e Segurança dos alimentos. Aveiro: Departamento de Química – Universidade de Aveiro.

Flores, E.F. e Weiblen, R. (2008). O vírus do Nilo Ocidental. *Ciência rural*, 39 (2).

Galvão, L. (2009). Dietas alimentares dos bovinos mirandeses: composição e variação ao longo do ano. *Boletim da Associação dos Criadores de Bovinos de Raça Mirandesa*. Separata nº. 143, (pp. 3 – 8).

Gauer, L., Albarus, M. H. and Cavalli-Molina, S. (2001). Variabilidade isoenzimática em progênes de biótipos apomíticos de *Paspalum dilatatum*. *Ciência Rural*, 31 (5): 799-804.

Gonçalez, E., Pinto, M. M. & Felicio, J. D. (2001). Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. *Biológico*, São Paulo, 63 (1/2): 15 – 19.

Guerra, M. M., Martins, H. M., Gouveia M. F. & Bernardo, F. (2005). Aspectos da segurança sanitária dos alimentos compostos para cavalos. *Revista Portuguesa de Zootecnia* XII (002): 63 – 75.

- Higgins, A. J. and Wriqth, I. M. (1995). *The Equine manual*, (pp. 984 – 986). WB Saunders Company.
- Hodgson, J.L., Hughes, K. J. and Hodgson, D. R. (2008). Diagnosis of bacterial infection. Part 1: principles of sample collection and transportation. *Equine Veterinary Education*, 20(11): 608 – 616.
- Hopkins, M. F., Gill, W. and Goddard, J. (2005). Dallisgrass staggers. *Chattanooga AgCredit*, (número de Maio, 2005), Acedido em Maio, 18, 2010, disponível em <http://animalscience.ag.utk.edu/beef/pdf/DallisgrassStaggers-FH-WWG-JG-2004.pdf>
- Huntington, P., Myers, J. and Owens, E. (2004). Horse sense: The guide to horse care in Australia and New Zealand. (2nd Edition). Australia: Landlinks Press.
- Jakab, G. J., Hmielecki, R. R., Zarba, A., Hemenway, D. R. and Groopman, J. D. (1990). Respiratory aflatoxicosis: Supression of pulmonary and systemic host defenses in rats and mice. In *Toxicol. App. Pharmacol.* 125: 198 – 205.
- Johnson, P. J. Casteel, S. T., Messer, N. T. (1997). Effect of feeding deoxynivalenol (vomitoxin)-contaminated barley to horses. *J. Vet Diagn Invest*, 9: 219-221.
- Jubb, K.V., Kennedy, P.C. and Palmer, N. (1993). Pathology of domestic animals. (4th edition) (vol. 2). San Diego: Academic Press.
- Kellerman, T. S. (2004). Mycotoxicoses of importance in farm animals in South Africa. *Vetpath Veterinary Pathologists*, n.8, disponível em http://www.vetpath.co.za/large_8_mycotoxicoses_of_importance_in_farm_animals_in_south_africa.htm
- Knowmycotoxins. (2008). Nutritionist – equine. Acedido em Março 7, 2010, disponível em <http://www.knowmycotoxins.com/>
- Krewer, C. C., Costa, M. M., Schrank, I. e Vargas, A. C. (2008). Artigo de Revisão: *Rhodococcus equi*. *Arq. Inst. Biol.* 75 (4): 533 – 545.
- Krska, R. and Welzig, E. (2006). The future of mycotoxins analysis. *Feed Mix*, 14 (1): 9, disponível em www.agriworld.nl-9.
- Kurtzman, C. B., Horn, B. W., and Hesseltine, C. W. (1987). *Aspergillus nomius*, a new aflatoxina producing species related to *aspergillus flavus* and *aspergillus tamari*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 53: 147 – 148.
- Lacey, J. (1991). Natural occurrence of micotoxins growing and conserved forage crops. In J. E. Smith and R. E. Henderson (Eds), *Mycotoxins and animal foods*. Boca Raton : CRC Press
- Lavoie, J. P. and Hinchcliff, K. W. (2008). Blackwell's five minute veterinary consult: Equine. (2nd edition). USA: Blackwell Publishing.
- Lemos, J.S., De Toni, L., Fortes, T., Silveira, P., Ladeira, S. e Coimbra, H. (2007). *Klebsiella pneumoniae* isolada de abortos de equino. XVI Congresso de Iniciação Científica, Faculdade de Agronomia Eliceu Maciel, disponível em http://www.ufpel.edu.br/cic/2007/cd/pdf/CA/CA_01508.pdf
- Lewis, L. D. (1995). Equine clinical nutrition: feeding and care. (6th edition). U.S.A.: Williams and Wilkins.

- Lino, C. M., Silva, L. J. G. e Pena, A. S. (2004) . Fumonisin: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 99 (552): 181 – 192.
- Lino, C. M., Silva, L. J. G. e Pena, A. S. (2007). Avaliação da exposição às fumonisinas: biomarcadores. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 102 (561 – 562): 5 – 15.
- Loretti, A. P., Colodel, E. M., Driemeier, D., Corrêa, A. M., Bangel, J. J. and Ferreiro, L. (2003). Neurological disorder in dairy cattle associated with consumption of beer residues contaminated with *Aspergillus clavatus*. *J. Vet.Diagn. Invest.*, 15: 123 – 132.
- Luciano, H., Lovatto, P. A., Kunrath, M. A., Carvalho, A. A., Garcia, G. G e Mallmann, C. A. (2006). Digestibilidade de dietas e balanços metabólicos de suínos alimentados com dietas contendo aflatoxinas. *Ciência Rural*, 36 (005): 1570 – 1575.
- Madeira de Carvalho, L.M. (2001). *Epidemiologia e controlo da estrongilidose em diferentes sistemas de produção equina em Portugal*. Tese de Dissertação de Doutoramento. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.
- Malikides, N., Hodgson, D. and Rose, R. J. (2000). Neurology. In R. Rose and D. Hodgson, *Manual of equine practice*, (pp.503 – 534). WB Saunders Company.
- Manual Merck de Veterinária (6º edição). (2007). Barcelona: Editorial Océano.
- Marasas, W.F., Kellerman, T.S., Gelderblom, W.C., Coetzer, J.A., Thiel, P.G., van der Lugt, J.J. (1988). Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 55: 197–203.
- Marques, M. e Martins, H. M. (2008). Comparison of the validation of two analytical methods for fungal toxins according to RELACRE and the European Decision 2002/657/EC. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 103 (565 – 566): 83 – 89.
- Martins, H. M., Almeida, I., Marques, M. e Bernardo, F. (2008). Interaction of wild strains of *Aspergilla* with *Aspergillus parasiticus* ATCC15517 and aflatoxina production. *Int J Mol Sci*, 9 (3): 394 – 400.
- Martins, M. L., Guerra, M. M. & Bernardo, F. (2007). Occurrence of aflatoxin B1 in dairy cow's feed over 10 years in Portugal (1995 – 2004). *Revista iberoamericana de Micologia*, 24: 69-71
- Martins, H. M., Magalhães, S. A. (2007). Determinação de aflatoxinas B1 e M1 em fígados de suíno por cromatografia líquida de alta resolução. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 102 (563 – 564), 315 – 319.
- Martins, M. L. e Martins, H. M., (2000). Natural occurrence of aflatoxins in cattle feed in Portugal (1996/ 1999). In A. Logrieco (Ed), *Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feed in Europe*. (pp. 131 – 146). Italy: COST Action 835.
- Martins, M.L., Martins, H.M. & Bernardo, F. (2003). Fungal flora and mycotoxins detection in commercial pet food. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 98 (548): 179 – 183.
- Martins, M. L., Martins, H.M., Bernardo, F. & Guimeiro, A. (2005). Capacidade de estirpes indígenas de *Aspergillus niger* para produzirem ocratoxina A em substrato natural (milho). *Revista Portuguesa de Ciências veterinárias*, 100 (555 – 556): 189 – 192.

McMullen, M. and Stoltenow, c. (2002). Ergot. *NDSU Extension Service, North Dakota State University of Agriculture and Applied Science*. Acedido em Maio, 17, 20010, disponível em <http://www.ag.ndsu.edu/pubs/pantsci/crops/pp551.pdf>

Mizrahi, A. and Miller, G. (1968). Long-term preservation of nonsporulating strain of *Claviceps paspali*. *American Society for Microbiology*, 16 (7): 1100 – 1101.

Moore, G., Sanford, P. and Wiley, T. (2006). Perennial pastures for Western Australia. *Department of Agriculture and Food Western Australia, bulletin 4690*, Perth.

Morgado, J. C. (2001). Clostridioses em confinamento. Acedido em Maio, 24, 2010, disponível em http://br.merial.com/rage/artigos_tecnicos/Clostridioses_Confinamento_Final.pdf

Morgavi, D. P. and Riley, R. T. (2007). An historical overview of field disease outbreaks know or suspected to be caused by the consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. *Animal Feed Science and technology*, 137: 210 – 212.

Morris, D. (1999). Guia Essencial do Comportamento do Cavalo. (2º Edição). Mem Martins: Publicações Europa-América, LDA.

Murphy, M. J. (1995). Toxicology. In C. Kobluk, T. Ames and R. Geor, *The horse diseases and clinical management*. (vol. 2) (pp. 1168 – 1260). WB Saunders Company.

Newman, J. R., Hedderson, E. J., Adams V. J., McGorum, B.C., Proudman, C. J. and Wood, J. L. N. (2004). An epidemiological study of risk factors associated with the recurrence of equine grass sickness (dysautonomia) on previously affected premises. *Equine Veterinary Journal*, 36 (2): 105 – 112.

Newman, K.E. (2006). Effects of mycotoxins in the equine – what we know and what we do not know. The World Mycotoxin Forum, the 4th Conference, November, 6 – 8, 2006. Cincinnati, Ohio, USA.

Newman, K. E. and Raymond, S.L. (2005). Effects of mycotoxins in horses. In D. Diaz (Ed), *The mycotoxin blue book*. (pp. 57 – 76). U.K.: Nottingham University Press.

NP (Norma Portuguesa) 3256, 1988. Alimentos para animais. Colheita de amostras.

NP (Norma Portuguesa) 3812-1, 1990. Embalagens. Sacos. Condicionamento para ensaios. Parte 1: sacos de papel.

Oehme, F. W. (2009). The 10 most common poisoning in production animals. Kansas State University, Manhattan: 81st Western Veterinary Conference, acedido em Maio, 19, 2010, disponível em http://wvc.omnibooksonline.com/data/papers/2009_V311.pdf

Oliveira, E. C. (1996). Introdução à biologia vegetal. Edusp; pp. 22 – 23.

Osweiler, G. D. (2000). Micotoxins: Contemporary Issues of Food Animal Health and Productivity. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16 (3): 720-749.

Peraica, M., Radic, B. Lucic, A. And Pavlovic (1999). Toxic effects of mycotoxins in humans. In *Bulletin of the World Health Organization*, 77 (9): 754 – 766.

Perusia, O. R. and Rodríguez, R. (2001). Micotoxicosis. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 12 (2): 87 – 116.

- Poppenga, R. H. (2009). Mycotoxins. In N. E. Robinson & K. A. Sprayberry, *Current Therapy in Equine Medicine*. (6th edition). (pp. 933 – 935). Missouri: Saunders Elsevier.
- Quin, P. J., Carter, M. E., Markey, B. and Carter, G.R. (1999). Clinical veterinary microbiology. USA: Elsevier Limited.
- Raymond S.L., Smith T.K., Swamy H.V. (2003). Effects of feeding of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on feed intake, serum chemistry, and hematology of horses, and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. *Journal of Animal Science*, 81 (21): 23-2130.
- Reed, S. & Bayly, W. (1998). Toxicologic problems, diseases of specific body systems. In *Equine Internal Medicine*. (pp. 995 – 1031). W.B. Saunders Company.
- Rego, B. M. C. (2008). *Estudo da infecção natural por protozoários dos géneros babesia e theileria numa exploração coudélica do Ribatejo*. Dissertação de Mestrado em Clínica de equinos. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Riet-Correa, F., Mendez, M.C., Bergamo, P.N. and Flores, W.N. (1988). Agalactia, reproductive problems and neonatal mortality in horses associated with the ingestion of *Claviceps purpurea*. *Australian Veterinary Journal*, Vol 65, 6:192-193.
- Robert, N. and Oglesby D. V. M. (2009). Grass staggers in horse: perennial ryegrass and dallis grass (*paspalum*) poisoning. Acedido em Maio, 20, 2010, disponível em <http://www.horseadvice.com/horse/messages/4/15136.html>
- Russel,L., Cox, D. F., Larsen, G., Bodwell, K. and Nelson, C. E. (1991). Incidence of molds and mycotoxins in commercial animal feed mills in seven Midwestern states, 1988-89. *Journal of Animal Science*. 69: 5.
- Santos, F. C., Souza, M. V., Graça, D. L., Vargas, A., Moreira, J. C. e Zandim, B. M. (2008). Piodermite profunda por *Staphylococcus intermedius* em equinos. *Ciência Rural* 38 (9): 2641-2645.
- Santos, J.A. (1975). *Patologia especial dos animais domésticos (mamíferos e aves)*. (nº. 27). Rio de Janeiro: Editorial IICA (Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas).
- Scarratt, W., K. (2004). Cerebellar disease and disease characterized by dysmetria or tremors. *Veterinary Clinics Food Animal Practice*, (vol. 20) (pp. 275 – 286).
- Sinha, A. K. and Cox, J. H. (1995). Diseases of the brain. In C. Kobluk, T. Ames and R. Geor (Eds), *The horse diseases and clinical management*. (vol.1), (pp. 463 – 464), WB Saunders Company.
- Smith, B. L. and Towers, N. R. (2001) Micotoxicoses em animais em pastoreio na Nova Zelândia. *Revista Portuguesa de Buiatria*, 5 (6): 27 – 34.
- Smith, G.W., Constable, P.D., Foreman, J.H., Eppley, R.M., Waggoner, A.L., Tumbleson, M.E. and Haschek, W.M. (2002). Cardiovascular changes associated with intravenous administration of fumonisin B1 in horses. *Am. J. Vet. Res.* 63: 538-545.
- Smith, J. E. and Moss, M. O. (1985). Mycotoxins, formation, analysis and significance. Ed. John, Wiley e Sons Lda. Chichester, UK, 148p.
- Staples, P. (2000). *Aeromonas*, *plesiomonas* and *vibrio* bacteria isolated from animals in New Zealand. *Surveillance* 27 (1): 3 – 4.

Stockman-Juvala, H. (2007). *Neuro and Immunotoxic effects of fumonisin B1 in cells*. Ph. D. Thesis. Helsinki: Department of Biochemistry and Pharmacy, Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki.

Toma, B., Dufour, B., Sanaa, M., Benet, J., Shaw, A., Moutou, F., Louzã, A. (2004). *Epidemiologia Aplicada à luta colectiva contra as principais doenças animais transmissíveis*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.

Valentic, I. (1994). Has the mystery of the Eleusinian Mysteries been solved? In *yearbook for Ethnomedicine and the Study of consciousness*. Issue 3, pp. 325 – 336.

White, J. F. and Torres, M. S. (2009). *Defensive mutualism in microbial symbiosis*. (Vol. 27). Florida: Taylor & Francis Group.

Whitlow, L. W., Hegler, W. M. and Hopkins, B. A. (1998). Mycotoxin occurrence in farmer submitted samples of North Carolina feedstuffs: 1989 – 1997. In *J. Dairy Sci.* 81 (Abstr.) 1189.

World Health Organization (2000). *Fumonisin B1 – International programme on chemical safety*. Geneva: WHO.

World Health Organization (2001). *Safety evaluation of certain mycotoxins in food – International programme on chemical safety*. Geneva: WHO, (pp. 103 – 279).

Wright, R.G., Boyce, B., Van Dreumel, T., Hazlett, M.J. and Cross, D.L. (2001) Ergot alkaloid toxicity in foaling mares associated with eating cereal rye straw. *Abstract presented at Equine Nutrition and Physiology Symposium*, Lexington KY May 28/01.

Wright, B. (2005). Molds, micotoxins and their effect on horses. Acedido em Março, 18, 2010, disponível em: http://www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/horses/facts/info_mycotoxin.html.

Zanine, A. M., Santos, E. M., Ferreira, D.J. e Cecon, P. R. (2006). Habito de pastejo de equinos em pastagens tropicais de diferentes estruturas. *Arquivo de ciências Veterinárias e Zootécnicas, Umuarama*, 9 (1): 83 – 89.